

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Bernhard Aigner

Angefertigt am Helmholtz Zentrum München  
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)  
(PD Dr. Markus Brielmeier)

**Kombination der Rekombinationssysteme Cre/loxP und Dre/rox  
für den genetischen *rescue* in *knockout*-Mausmodellen am  
Beispiel der mitochondrialen Thioredoxinreduktase**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Ramona Böhm  
aus Weiden i. d. Opf.

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatte: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Joachim Gabius  
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Martin Förster  
Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers  
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

*Für Joachim*

*Es gibt keine reine Wahrheit, aber ebensowenig einen reinen Irrtum.*

*(Christian Friedrich Hebbel)*

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zielsetzung der Arbeit.....	1
1.2	Beschreibung des Systems zum genetischen rescue der Txnrd2.....	2
1.3	Klonierungsstrategie zur Generierung transgener Mäuse.....	3
1.3.1	Pankreasspezifisches <i>knockout</i> -Modell.....	3
1.3.2	Induzierbares <i>knockin</i> -Modell.....	4
1.3.3	Ablauf der Generierung genetisch modifizierter Mäuse.....	6
2	Literatur.....	10
2.1	Generierung genetisch modifizierter Mäuse.....	10
2.1.1	Mutagenese.....	10
2.1.2	Transgenese.....	10
2.1.3	Genloci.....	17
2.1.4	Homologe Rekombination.....	19
2.1.5	Transgenintegration.....	20
2.2	Selen.....	22
2.2.1	Geschichte und Bedeutung des Selens.....	22
2.2.2	Selenoproteine.....	25
2.2.3	Thioredoxinreduktase.....	27
3	Material.....	30
3.1	Chemikalien.....	30
3.2	Enzyme.....	34
3.3	Lösungen und Puffer.....	35
3.4	Bakterien/Zelllinien und Zellkulturmedien.....	37
3.5	Verbrauchsmaterialien und Kits.....	38
3.6	Materialien für Klonierung.....	40
3.7	Materialien für Western Blot.....	45
3.8	Materialien für TaqMan.....	46
3.9	Materialien für Southern Blot.....	46
3.10	Maushaltung.....	46
3.11	Transgene Mauslinien.....	47
3.12	Geräte.....	47
3.13	Software.....	49

4 Methoden .....	50
4.1 Klonierung.....	50
4.1.1 Enzymatischer Restriktionsverdau mittels Restriktionsendo-nukleasen .....	50
4.1.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden .....	51
4.1.3 Herstellung von <i>blunt ends</i> .....	51
4.1.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	52
4.1.5 Ligation.....	53
4.1.6 Transformation von kompetenten Stbl3-Bakterien.....	54
4.1.7 Überprüfung (Screen) transformierter Bakterien .....	55
4.1.8 Plasmidpräparation .....	57
4.1.9 Analytische Gelelektrophorese .....	58
4.1.10 Gateway Technologie .....	58
4.2 In vitro Testung der beiden klonierten Konstrukte .....	61
4.2.1 Zellkultur.....	61
4.2.2 Western Blotting.....	66
4.3 Evaluierung der Screen-PCR zur Überprüfung selektionsresistenter ES-Zellklone .....	70
4.3.1 Prüfung der Screen-PCR für die ROSA26 Klone.....	70
4.3.2 Etablierung der Screen-PCR für die Hprt Klone.....	71
4.4 ES-Zellkultur .....	71
4.4.1 Kultur von embryonalen Stammzellen (IDG3.2).....	71
4.4.2 Linearisierung der Targeting-DNA .....	72
4.4.3 Elektroporation .....	72
4.4.4 Selektion positiver ES-Zellklone.....	73
4.5 Screen-PCR der potentiell positiven Zellklone .....	75
4.5.1 ROSA26 ES Screen-PCR .....	75
4.5.2 Überprüfung der Screen-PCR positiven ROSA26-Klone mit PCR und TaqMan ...	75
4.5.3 Hprt ES Screen-PCR .....	79
4.5.4 Southern Blot Analyse der genomischen DNA der Hprt-Klone .....	80
4.6 Mykoplasmentest der ROSA26 und Hprt ES-Zellklone .....	83
4.7 Blastozysteninjektion .....	83
4.8 Gewinnung von genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien .....	86
4.9 Testen von Chimären auf Keimbahngängigkeit.....	86
4.10 Tierhaltung.....	87
4.11 Zucht und Kreuzung der transgenen Linien.....	87
4.11.1 Pankreasspezifische <i>Txnrd2</i> knockout-Linie.....	87
4.11.2 Gefloxt mitochondriale Thioredoxinreduktase Mauslinie.....	87

4.11.3 Ptf1a-Cre <sup>tg/wt</sup> Mauslinie .....	89
4.12 In vivo Prüfung des ROSA26-Transgens .....	92
4.12.1 $\beta$ -gal Färbung der Embryonen .....	92
5 Ergebnisse .....	93
5.1 Klonierung .....	93
5.1.1 Klonierung von pROSA26-roxSTOProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ .....	93
5.1.2 Klonierung von pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 .....	100
5.2 Überprüfung der einzelnen Module der Targetingkonstrukte in vitro .....	112
5.2.1 Reportergen LacZ .....	112
5.2.2 STOP-Kassetten: Rekombination der rox-sites mit Dre, Dichtigkeit und Expression des Zielgens nach Entfernung der STOP-Kassetten .....	115
5.2.3 <i>Txnrd2</i> -ORF und SECIS-Element .....	124
5.3 Etablierung von Screening-Strategien .....	126
5.3.1 Prüfung der Wirksamkeit der ROSA26 ES Screen-PCR .....	126
5.3.2 Planung der Primerbindungsstelle in pDTA-Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 zur Evaluierung des ES-Zellscreens für den Hprt-Lokus .....	126
5.4 Herstellung und Screening von rekombinanten ES-Zellen zur Injektion .....	130
5.4.1 ES-Zell Elektroporation .....	130
5.4.2 Nachweis korrekt integrierter ROSA26 ES-Zellen .....	130
5.4.3 Nachweis korrekt integrierter Hprt ES-Zellen .....	135
5.5 Mykoplasmentest ROSA26- und Hprt-Klone .....	140
5.6 Herstellung und Screening von chimären Mäusen .....	140
5.6.1 Injektion der ROSA26 ES-Zellklone in BDF1-Blastozysten .....	140
5.6.2 Anzahl der sich entwickelten Nachkommen und Bestimmung des Grades an Chimärismus .....	141
5.7 Rückkreuzung der Chimären und Test auf Keimbahntrans-mission .....	142
5.8 Funktioneller Test der ROSA26-Maus durch Kreuzung mit einem ubiquitären Dre- deleter .....	143
6 Diskussion .....	145
6.1 Klonierung der Targetingvektoren .....	145
6.1.1 Klonierungsstrategie - Verwendete Rekombinationssysteme .....	145
6.1.2 Klonierungsstrategie – Induktion der <i>Txnrd2</i> -Expression .....	146
6.2 Klonierung .....	147
6.3 Zielgerichtete Integrationsverfahren (gene targeting) .....	148
6.4 Verwendete Genloci - Strategie und Rekombinationseffizienz .....	149
6.5 In vitro Prüfung einzelner Targetingmodule .....	151
6.5.1 Reportergen LacZ .....	151

6.5.2	Transiente Transfektion .....	151
6.5.3	Spontanrekombination .....	152
6.5.4	Rekombinationseffizienz in vitro.....	153
6.5.5	Western Blot.....	153
6.6	Elektroporation in ES-Zellen .....	154
6.7	Screening-Verfahren der ES-Zellklone .....	155
6.8	Selektion der ES-Zellen .....	155
6.9	Blastozysteninjektion .....	156
6.10	Chimärismus und Keimbahntransmissivität.....	157
6.11	Funktioneller Test der ROSA26 Maus .....	158
6.12	Ausblick .....	159
7	Zusammenfassung.....	161
8	Summary .....	164
9	Literaturverzeichnis .....	166
10	Anhang.....	187
10.1	Abbildungsverzeichnis .....	187
10.2	Tabellenverzeichnis .....	192
10.3	Formelverzeichnis.....	193
10.4	Abkürzungsverzeichnis.....	193
10.5	Aminosäuresequenzen .....	200
11	Danksagung .....	203

# 1 Einleitung

Die Maus stellt das am häufigsten verwendete tierische Modellsystem zur Klärung von physiologischen und pathologischen Zuständen des Menschen dar (Leiter et al., 1987; Tomayko & Reynolds, 1989). Als Säugetier mit kurzer Generationszeit und großen Würfen, wie auch effizienter und kostengünstiger Nutzung ist die Maus schon seit langer Zeit ein interessantes Versuchstier. Mit der Sequenzierung des Genoms von Mensch (Lander et al., 2001) und Maus (Waterston et al., 2002) eröffneten sich neue Wege zur Entwicklung und Etablierung von Transgenmodellen. Dies wurde durch Methoden zur gezielten genetischen Modifizierung (Metzger & Feil, 1999) wie auch durch die Manipulation embryonaler Stammzellen, die bei der Maus zur Verfügung stehen (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981), noch verstärkt. Dem Einsatz von transgenen Tiermodellen kommt in der biomedizinischen Forschung eine immer bedeutendere Rolle zu, wie die Versuchstierzahlen der letzten zehn Jahre des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) zeigen (BMELV; 2012).

Für die Generierung transgener Tiere sind unterschiedliche Strategien und Techniken anwendbar, nämlich ein Funktionsgewinn durch das Transgen (*gain of function*) und/oder ein Funktionsverlust von Wirtsgenen (*loss of function*), z.B. durch die Inaktivierung von spezifischen Gensequenzen (*knockout*), Genmodifikation (*knockin*) oder Unterdrückung der Synthese von Wirtsgenprodukten (*knockdown*, *gene silencing*) (GV-SOLAS; 2012).

## 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit baut auf Vorarbeiten auf, in denen mittels eines Cre/loxP basierten konditionalen *knockout*-Modells gezeigt wurde, dass die mitochondriale Thioredoxinreduktase (*Txnrd2*) essentiell für die Embryonalentwicklung ist (Conrad et al., 2004). Homozygote *Txnrd2*-defiziente murine Embryonen verstarben bereits um den Tag E13.0. Aufgrund der embryonalen Letalität dieser Mausmutante, ausgelöst durch die Inaktivierung eines für den Organismus lebenswichtigen Gens, wurden gewebsspezifische *Txnrd2-knockouts* zur Untersuchung der redox-regulierenden mitochondrialen Thioredoxinreduktase generiert. Dabei zeigte sich, dass die *Txnrd2* wichtig für die Entwicklung und Funktion des adulten Herzens ist (Conrad et al.,



2004). Kürzlich konnte Aichler in ihrer Dissertation zeigen, dass die pankreasspezifische Ausschaltung der *Txnrd2* zu einer progressiven Pankreaserkrankung mit Pankreashypotrophie und fibrotischem Umbau ab der 4. Lebenswoche führt (Aichler, 2007).

Ziel dieser Arbeit war es, ein System zu etablieren, mit dem man, aufbauend auf diesem pankreasspezifischen *knockout*-Modell, die Aktivität der *Txnrd2* wieder anschalten kann (sog. genetischer *rescue*). Somit soll in weiterführenden Arbeiten festgestellt werden, ob der im *knockout* vorhandene Phänotyp durch temporäre Induktion der Genexpression beeinflusst werden kann oder gar reversibel ist.

## **1.2 Beschreibung des Systems zum genetischen rescue der *Txnrd2***

Es wurde eine Komplementationsstrategie aus dem bestehenden Cre/loxP- und dem Dre/rox-Rekombinationssystem gewählt:

Der *knockout* wurde durch Kreuzung einer unter dem Einfluß des pankreasspezifischen Ptf1a-Promotors stehenden Cre-transgenen Mauslinie mit einer von loxP-Sequenzen flankierten (sog. geflochten) *Txnrd2*-Mauslinie generiert. Für die Wiederherstellung der Expression der mitochondrialen Thioredoxinreduktase sind zwei weitere transgene Mauslinien erforderlich. Zum einen eine pROSA-roxSTOProx-*Txnrd2*-lresLacZ- und zum anderen eine pHprt-loxSTOPlox-DreERT2-Mauslinie. Die Kombination aller vier Linien erlaubt die Sequenz folgender Schritte in einer Maus: 1) Durch die pankreasspezifische Ausschaltung der *Txnrd2* während der Embryogenese entsteht ca. 4 Wochen post partum der von Aichler beschriebene Phänotyp (Aichler, 2007). 2) DreERT2 im Hprt-Lokus codiert die Dre-Rekombinase, die fusioniert ist mit der mutierten Östrogenbindedomäne ERT2. Das Fusionsprotein DreERT2 wird während der Embryogenese durch die promotorbedingt gewebsspezifische Cre-Rekombination der vorgeschalteten loxSTOPlox-Kassette im Pankreas exprimiert, jedoch erst bei Anwesenheit des synthetischen Antiöstrogens Tamoxifen, nicht jedoch durch das endogene Östrogen aktiviert. 3) Dre gelangt nach Aktivierung durch Tamoxifengabe in den Zellkern und bewirkt dort die Expression der mitochondrialen Thioredoxinreduktase durch Rekombination der vorgeschalteten roxSTOPprox-Kassette im ROSA26-Lokus. 4) Die erneute Anschaltung der *Txnrd2* im Pankreas nach Induktion des Dre-Rekombinationssystems mit Tamoxifen zu einem

beliebigen Zeitpunkt erlaubt anschließend die Beobachtung eventueller Veränderungen des Phänotyps.

Dieses Transgenmodell, das exemplarisch zur Untersuchung der Funktion des *Txnrd2* genutzt werden soll, bietet darüber hinaus die Möglichkeit für induzierbare *knockout/knockin* Studien bei allen konditionalen, Cre-rekombinanten *knockout*-Modellen und damit für eine Vielzahl gewebsspezifischer *rescue*-Modelle.

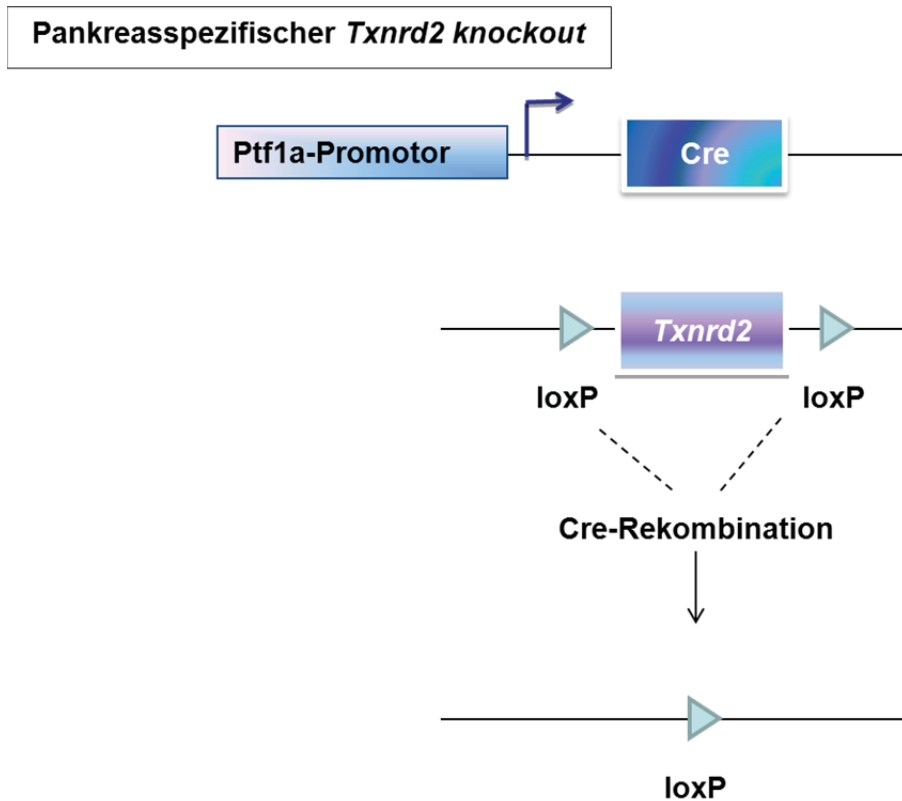
### **1.3 Klonierungsstrategie zur Generierung transgener Mäuse**

Im Folgenden wird die Klonierungsstrategie wie auch das weitere Vorgehen zur besseren Übersicht kurz geschildert.

Für die Klonierung wurde eine konditionale, induzierbare *knockin* Strategie gewählt.

#### **1.3.1 Pankreasspezifisches *knockout*-Modell**

Im bereits bestehenden pankreasspezifischen *Txnrd2-knockout* Modell wurden die Exons 15 bis 18 der mitochondrialen Thioredoxinreduktase mit zwei loxP-Stellen flankiert. Durch Kreuzung dieser geflochtenen *Txnrd2*-Mauslinie (Conrad et al., 2004) mit einer Cre-transgenen Mauslinie unter Kontrolle des pankreasspezifischen Ptf1a-Promotors (Nakhai et al., 2007) kommt es zu einem pankreasspezifischen *Txnrd2-knockout* (Abbildung 1).

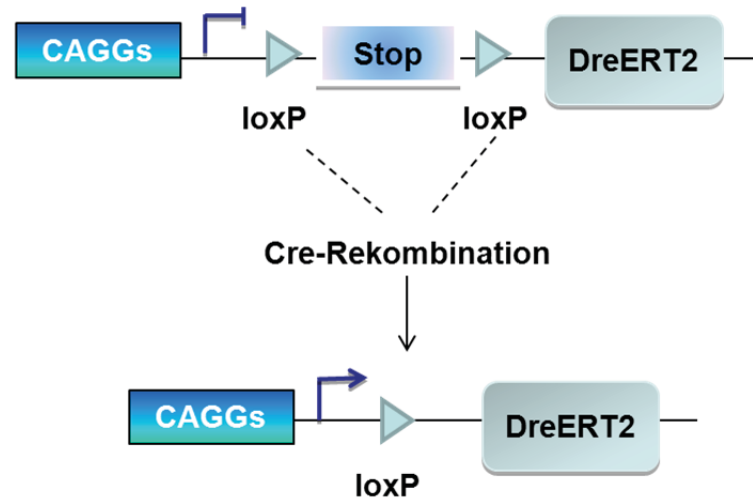


**Abbildung 1: Schema des pankreasspezifischen *knockouts* der mitochondrialen Thioredoxin-reduktase.** Kreuzung einer pankreasspezifischen Ptf1a-Cre Linie mit einer geflochten *Txnrd2* Mauslinie.

### 1.3.2 Induzierbares *knockin*-Modell

Beim induzierbaren *knockin* wird gleichzeitig mit der Cre-vermittelten Ausschaltung des endogenen *Txnrd2*-Lokus im Pankreas während der Embryonalphase eine inhibierte DreERT2-Expression im Hprt-Lokus freigegeben (Abbildung 2). Dre wird allerdings erst durch die Bindung von Tamoxifen an die Steroidbindedomäne ERT2 aktiviert und gelangt dadurch in den Zellkern.

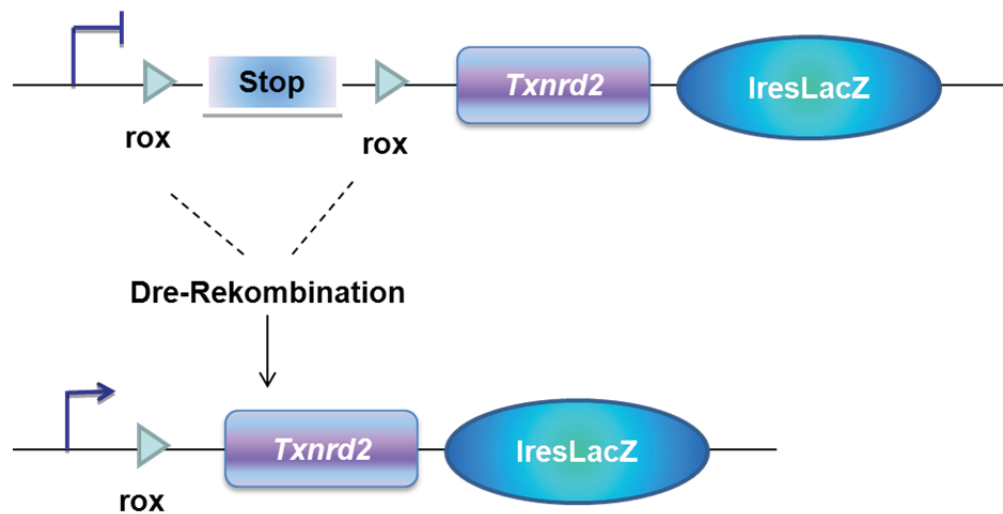
**DreERT2 Linie im HPRT Lokus**



**Abbildung 2: DreERT2 Linie im Hprt-Lokus.** DreERT2-Transkription ist durch eine vorgeschaltete gefloxt Stop-Kassette solange unterdrückt, bis die STOP-Kassette durch Cre-Rekombination entfernt wird. Das geschieht in einer pankreasspezifischen Ptf1a-Cre-Maus während der Embryonalentwicklung. Durch Rekombination der loxSTOPlox-Kassette wird DreERT2 zwar durch den ubiquitär aktiven CAGGs-Promotor exprimiert, jedoch erst durch die Bindung von Tamoxifen an die Steroidbindedomäne ERT2 wird Dre aktiviert.

Im Zellkern rekombiniert Dre die rox-sites unter Entfernung der Stop-Kassette vor *Txnrd2*-IRES-LacZ im ROSA26-Lokus (Abbildung 3). Die Expression des *Txnrd2* knockin Allels führt damit zum genetischen *rescue* von *Txnrd2* im *knockout* zu jedem beliebigen Zeitpunkt gesteuert durch die Tamoxifengabe.

### ***Txnrd2*-IresLacZ Linie im ROSA26-Lokus**



**Abbildung 3: *Txnrd2*-IresLacZ Linie im ROSA26-Lokus.** Das durch Tamoxifenbindung aktivierte DreERT2 entfernt durch Rekombination der rox-sites die STOP-Kassette vor *Txnrd2* und führt damit zum genetischen *rescue* von *Txnrd2* im *knockout*. Die erfolgreiche Rekombination kann in vitro durch  $\beta$ -gal Färbung aufgrund der Ires getriebenen Expression des Reportergens LacZ verifiziert werden.

### **1.3.3 Ablauf der Generierung genetisch modifizierter Mäuse**

Für den gezielten Einbau der Transgene in das Wirtsgenom (*gene targeting*) besitzen die klonierten Targetingkonstrukte pROSA-roxSTOPprox-*Txnrd2*-IresLacZ und pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 auf beiden Seiten des Transgens Sequenzhomologien zum Ziellokus. Durch einen sequenzspezifischen Austausch der homologen Bereiche (sog. homologe Rekombination) wird der Abschnitt des Transgens zwischen den homologen Armen in den spezifischen Genlokus integriert. Für die Integration der beiden Konstrukte ins Mausgenom wurden als Genloci der ROSA26- und der Hprt-Lokus ausgewählt, von denen bekannt ist, dass eine Integration mit hoher Effizienz gelingt und eine ubiquitäre Expression möglich ist. Für die homologe Rekombination wurden pluripotente murine ES-Zellen mit dem linearisierten Targetingvektor elektroporiert. Da der Prozess der homologen Rekombination sehr selten ist (in etwa einer von  $10^5$  bis  $10^6$  Zellen) und Zufallsintegrationen weit häufiger auftreten, wurden die Zellklone auf die gewünschte Rekombination hin selektioniert. Der Targetingvektor enthält zu diesem Zweck einen innerhalb des homologen Bereichs liegenden positiven (z.B. Neomycin-Phosphotransferase II; neo) und einen außerhalb liegenden negativen (z. B. Diphtherietoxin A Fragment; DTA) Selektionsmarker, so dass resistente Einzelklone

isoliert und expandiert werden können. Durch die homologe Rekombination gehen die außerhalb der homologen Sequenzen liegenden Bereiche des Vektors inklusive des negativen Selektionsmarkers verloren. Zellen, bei denen die Rekombination durch Aufnahme des kompletten Targetingvektors fehlerhaft war, sterben durch Expression des Diphtherietoxins. Die positive Selektion erfolgt durch Zugabe von Geneticin G418, einem Aminoglykosid-Antibiotikum. Dadurch überleben nur Zellen mit stabil integriertem Transgen, das als Selektionsmarker das bakterielle Gen für die Neomycin-Phosphotransferase II („neo-Kassette“) besitzt. Im Falle des Hprt-Lokus wird zusätzlich noch eine Selektion mit dem für nicht rekombinierte Zellen toxischen 6-Thioguanin durchgeführt. Die nach der Rekombination Hprt-defizienten Zellen überleben die Selektion. Die durch Screen-PCR als erfolgreich modifiziert erkannten Klone werden mit PCR und TaqMan (ROSA26) oder charakteristischem Restriktionsverdau und Southern Blot (Hprt) untersucht, um das Rekombinationsereignis zu bestätigen. Dies dient dem Nachweis der korrekten Integration und dem Ausschluss zusätzlicher Mehrfachintegrationen. Anschließend werden etwa je 15 bis 20 solcher erfolgreich modifizierter heterozygoter Zellen in Blastozysten mikroinjiziert. Die Fellfarbe der Tiere für die Gewinnung der Blastozyste (z.B. „schwarz“ bzw. „nonagouti“, aa) unterscheidet sich dabei von der Fellfarbe der ES-Zell Spendertiere (z.B. „agouti“, AA). Bis zu 20 mikroinjizierte Blastozysten werden in ein scheinchwangeres Empfängerweibchen (Rezipient) transferiert. Daraus entwickeln sich genetische Chimären, deren Grad an Chimärismus anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden kann. Das Ausmaß der Fellfarbe des ES-Zell Spendertieres in der Fellfärbung der Chimären zeigt i.d.R. ungefähr den Anteil der Zellen im Tier an, die sich aus den injizierten ES-Zellen entwickelt haben.

Der Genotyp der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten IDG3.2 ES-Zellen ist männlich und dominant-mischerbig für die Fellfarbe agouti (A/a). Bei Injektion in BDF1 Blastozysten, die homozygot non-agouti (a/a) sind, äußert sich ein 100%iger Chimärismus in der Fellfarbe agouti, ein geringerer Chimärismus als schwarz-agouti Färbung.

Durch Rückkreuzung der Chimären mit C57BL6/N Wildtypmäusen kann geprüft werden, ob es sich um Keimbahnchimären handelt, d.h. ob während der Embryonalentwicklung aus genetisch veränderten ES-Zellen Keimbahnzellen hervorgegangen sind und damit die Mutation an die nächste Generation weitervererbt wird. Heterozygote Tiere der F1 Generation können anschließend

miteinander verpaart werden mit dem Ziel eine homozygote, transgene Linie zu generieren. Die Weitergabe des Transgens erfolgt dabei nach den Mendelschen Regeln, so dass 25% der F2 Generation homozygot und 50% heterozygot für das veränderte Allel sind, während 25% das veränderte Allel nicht besitzen und somit als Wildtyp (WT) bezeichnet werden.

In dieser Arbeit müssen nicht nur zwei transgene Allele, wie das in den meisten Fällen zur Generierung eines konditionalen *knockouts* der Fall ist, kombiniert werden, sondern insgesamt vier. Nur die Kombination der *Cre*-transgenen-, *Txnrd2*-gefloxten-, pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2- und pROSA26-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ-Mauslinie in einer Maus führt zum gewünschten Tiermodell (Abbildung 4). Die Kreuzung der vier Linien miteinander und die Verpaarung der jeweiligen heterozygoten Tiere wiederum untereinander zur Erlangung der Homozygotie dauert dabei im Idealfall drei bis vier Mausgenerationen, so dass die gewünschte transgene Mauslinie schnellstens in einem Zeitrahmen von 9 bis 12 Monaten erzeugt werden kann.

Die Beobachtung möglicher Veränderungen des pankreasspezifischen Phänotyps mittels dieser Strategie stellt dabei nur eine Einsatzmöglichkeit des vielseitig verwendbaren Systems dar. Dieses Modell lässt sich durch Austausch der pankreasspezifischen *Cre*-transgenen Linie mit einer beliebigen anderen gewebsspezifischen *Cre*-rekombinanten Linie auf verschiedene Organsysteme anwenden. Somit ergeben sich vielfältige Variationsmöglichkeiten der Untersuchung der mitochondrialen Thioredoxinreduktase in unterschiedlichen Organsystemen.

Dabei sind die *knockout/knockin*-Studien aber nicht nur auf die mitochondriale Thioredoxinreduktase beschränkt. Durch einen Kassettenaustausch von *Txnrd2* mit einem beliebigen Gen von Interesse lässt sich dieses System sowohl auf alle Gewebe, wie auch auf alle gewünschten Gene ausweiten.

Durch die Kombination der Rekombinationssysteme Fip/FRT, *Cre*/loxP und Dre/rox lassen sich Studien erstellen, bei denen unterschiedliche Gene gleichzeitig oder nacheinander in einem gewebsspezifischen *knockout* induziert werden könnten.

Diese Modifizierungsmöglichkeiten eröffnen damit neue Strategien zum sequentiellen An- und Abschalten von Genen in Tiermodellen. Voraussetzung für den Einsatz von einmal generierten transgenen Linien in solche neuen Projekte ist allerdings, dass sich die transgenen Allele auf verschiedenen Chromosomen befinden, da ansonsten keine unabhängige Weitervererbung möglich ist.

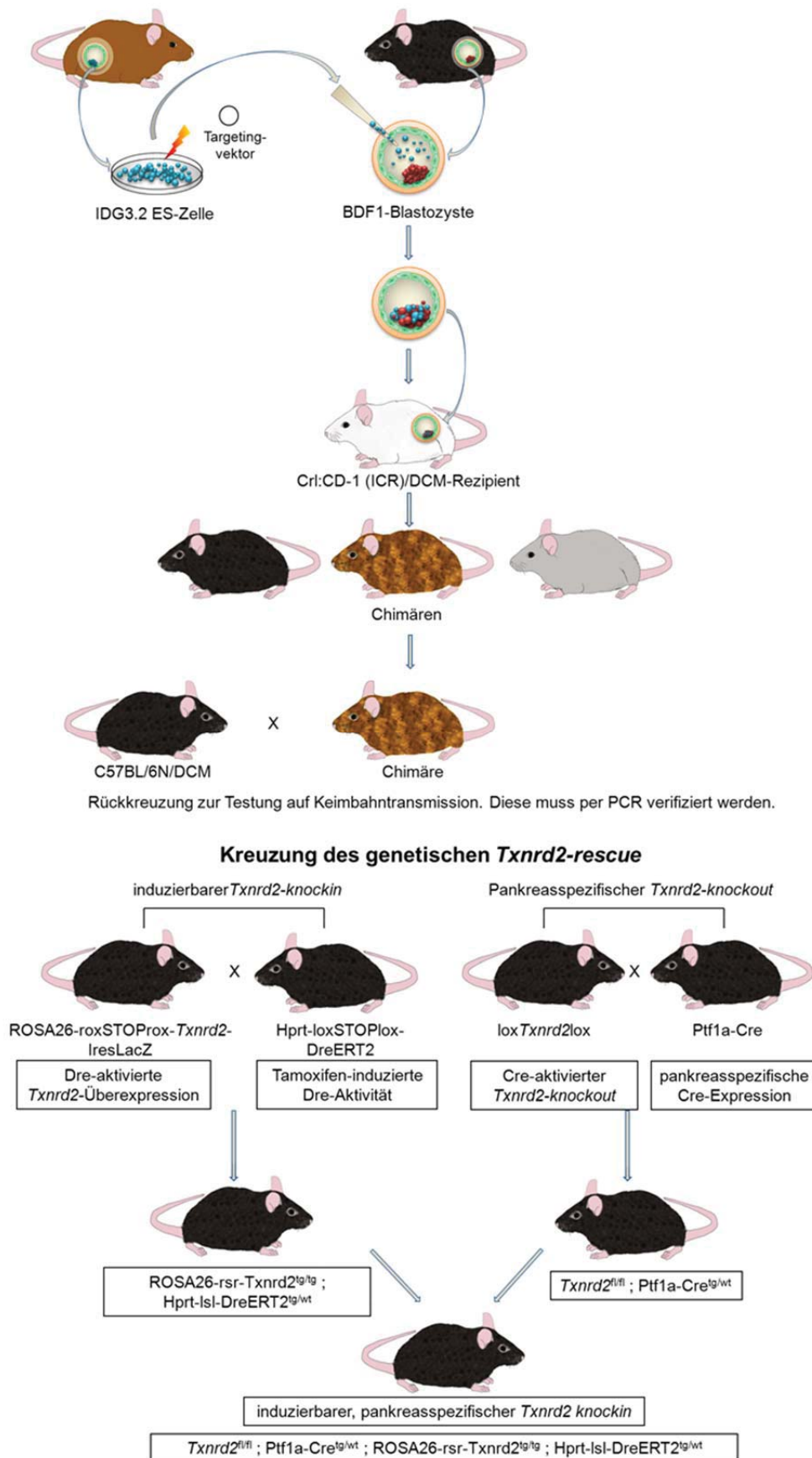


Abbildung 4: Ablauf der Generierung transgener Mäuse und Kreuzungsschema zur Etablierung des genetischen *rescue* des pankreasspezifischen *knockouts* der mitochondrialen Thiothredoxinreduktase durch einen induzierbaren *knockin* der *Txnrd2*.



## 2 Literatur

Gegenstand dieser Arbeit ist die Herstellung eines Tiermodells mit dem Ziel des genetischen *rescue* der mitochondrialen Thioredoxinreduktase. Zunächst soll deshalb die Methode zur Generierung genetisch modifizierter Mäuse beschrieben werden. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der Thioredoxinreduktase um ein Selenoprotein handelt, wird im Anschluss noch kurz auf die Eigenschaften von Selen und den Metabolismus von Selenoproteinen eingegangen.

### 2.1 Generierung genetisch modifizierter Mäuse

#### 2.1.1 Mutagenese

Mutagenese bedeutet die Erzeugung von Mutationen im Erbgut. Aufgrund der Tatsache, dass spontan auftretende Mutationen selten sind (ca.  $5 \times 10^{-6}$  pro Locus), wird die Mutationshäufigkeit durch physikalische (z.B. Röntgenbestrahlung) oder chemische (z.B. *N*-Ethyl-*N*-nitrosoharnstoff, ENU) Verfahren erhöht (Muller, 1927; Russell et al., 1979; Rinchik, 1991; Thomas et al., 1998; Justice et al., 1999; Schimenti et al., 2000). Diese Verfahren führen zu zufälliger Mutagenese (*random mutagenesis*). Die mutanten Nachkommen werden auf relevante phänotypische Veränderungen untersucht und die veränderten Gene anschließend gesucht. Somit kann anhand der phänotypischen Erscheinung das funktionale Zusammenspiel auf Genomebene untersucht werden (Bedell et al., 1997). Dieser Weg wird als *forward genetics* bezeichnet. Da in dieser Arbeit zielgerichtet Mutationen in das Genom eingebracht wurden (*gene targeting*), wird auf die Methodik der zufälligen Mutagenese nicht weiter eingegangen.

#### 2.1.2 Transgenese

Die Sequenzierung der Genome ist in den letzten Jahren immer schneller vorangeschritten. So sind das Genom des Menschen (Lander et al., 2001) und der Maus (Waterston et al., 2002) nur zwei Beispiele der bis dato vollständig sequenzierten Säugergenome (<http://www.ensembl.org>). Durch die Möglichkeit von Genom- und EST (*expressed sequence tag*)-Sequenzierungen, bei denen eine Vielzahl neuer Gene mit unbekannter biologischer Funktion gefunden wurden, wuchs auch das Interesse die in vivo Funktion bestimmter Gene zu verstehen (*functional*

*genomic research*) (Guan et al., 2010). Zur Aufklärung dieser Funktionen besteht die Möglichkeit der Herstellung transgener Mauslinien. Dabei resultiert die gezielte Mutation eines zu untersuchenden Gens möglicherweise in einem Phänotyp, der Rückschlüsse auf die Genfunktion zulässt (Weg der *reverse genetics*).

### **Sequenzspezifische Rekombinationssysteme (SSR)**

In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus zwei verschiedenen Rekombinationssystemen, dem Cre/loxP- und dem Dre/rox-System, verwendet. Sequenzspezifische Rekombinationssysteme (SSR) sind wichtige Werkzeuge zur Modifikation des Säuger-genoms. Die wohl wichtigsten und bekanntesten sind das Flp/FRT-System aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Schwartz & Sadowski, 1989; Sadowski, 1995), das Cre/loxP-System aus dem P1-Phagen (Hamilton & Abremski, 1984), sowie das Dre/rox-System aus dem D6-Phagen (Sauer & Mcdermott, 2004). Alle drei Rekombinationssysteme gehören zur Familie der Tyrosin-Rekombinasen (Birling et al., 2009) und weisen den gleichen Reaktionsmechanismus auf, der sich durch einen nukleophilen Angriff einer Tyrosin-Hydroxylgruppe auf das Phosphodiesterückgrat unter Ausbildung eines Holliday-Intermediats auszeichnet (Grindley et al., 2006). Diese Systeme fanden schon erfolgreiche Verwendung in der Maus (Sauer & Henderson, 1988; Farley et al., 2000; Nagy, 2000; Rodriguez et al., 2000; Branda & Dymecki, 2004; Anastassiadis et al., 2009) und sollen im Folgenden näher erläutert werden.

#### *Flp/FRT-Rekombinationssystem*

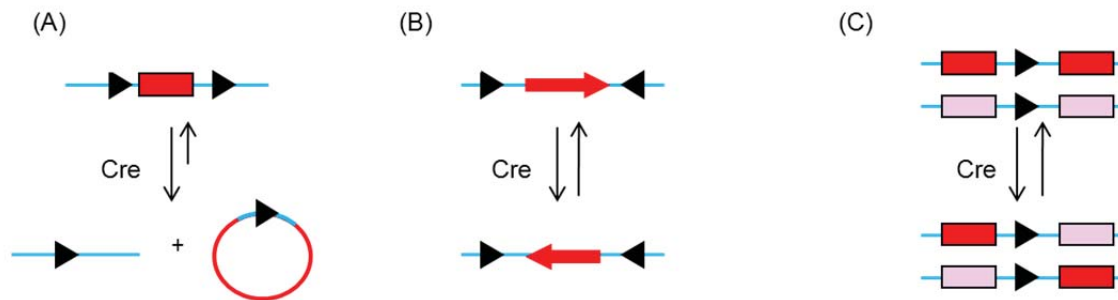
Dieses Rekombinationssystem entstammt der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit der 46kDa Rekombinase Flp und deren Erkennungsstellen FRT (*Flp recognition target*) (Dymecki, 1996). Das System ist auf einem Plasmid der Hefe codiert und führt durch Flp-vermittelte Inversion während der Replikation zur Erhöhung der Kopienzahl des Plasmids (Futcher, 1986). Die FRT-Sequenz besteht aus einer 8bp langen asymmetrischen Kernsequenz (*spacer*), die von zwei 13bp langen umgekehrten Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) umgeben ist. Dieses System ermöglicht durch Phosphotyrosylverbindungen Exzision, Inversion und Translokation von DNA-Segmenten (Gronostajski & Sadowski, 1985). Da die Flp-Rekombinase als Hefeenzym ein Temperaturoptimum von 30°C aufweist (Buchholz et al., 1996), wurde die codierende Sequenz durch in vitro-Mutagenese soweit verändert, dass Flp auch bei 37°C noch ausreichend stabil und enzymatisch aktiv ist. Diese neue Form

wird als „FLPe“ bezeichnet und bietet die Möglichkeit, auch in Säugerzellen Anwendung zu finden (Buchholz et al., 1998). Ebenso wurde eine Mauscodon-optimierte Flp-Variante „FLPo“ generiert, mit einer der Cre-Rekombinase annähernd vergleichbaren Rekombinationseffizienz (Raymond & Soriano, 2007). Da in dieser Arbeit ohne konkrete Anwendung, soll auf das Flp/FRT-Rekombinationssystem nicht weiter eingegangen werden.

#### *Cre/loxP-Rekombinationssystem*

Das Cre/loxP-System stammt aus dem Bakteriophagen P1. Das 38kDa Cre Enzym (Cre= *causes recombination*) katalysiert die Rekombination zwischen den 34bp langen loxP-Erkennungssequenzen (*sites*) (Sternberg & Hamilton, 1981). Es hat im Bakteriophagen die Aufgabe das lineare Phagengenom zu zirkularisieren (Hochman et al., 1983) und postreplikative zirkuläre Genomdimere in Monomere aufzulösen (Austin et al., 1981).

Die loxP-Zielsequenz (loxP= *locus of crossing over (x) in P1*) besteht aus zwei umgekehrten Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) von 13bp, die eine 8bp lange asymmetrische Kernsequenz (*spacer*) flankieren. Der *spacer* gibt der loxP-*site* durch seine Asymmetrie eine Richtung, wodurch eine Steuerung der Cre-vermittelten Reaktion gewährleistet wird (Abremski et al., 1983). Bei gleicher Orientierung der beiden loxP-*sites* auf demselben DNA-Strang wird die dazwischenliegende Sequenz in Form von zirkulärer DNA entfernt (Exzision). Befinden sich die loxP Stellen in gegensätzlicher Richtung auf dem gleichen DNA-Strang kommt es zu einer Inversion, also zu einem Umdrehen der dazwischenliegenden Sequenz. Liegen beide loxP-*sites* auf unterschiedlichen DNA-Molekülen in derselben Orientierung, bewirken sie einen Austausch der dahinterliegenden DNA-Sequenzen (Translokation) in einer intermolekularen Rekombination (Mansour et al., 1988) (Abbildung 5). Alle drei Formen sind dabei grundsätzlich reversibel, jedoch ist die Exzision kinetisch günstiger als die Insertion einer zirkulären extrachromosomalen DNA. DNA-Bereiche, die von zwei loxP-Sequenzen flankiert werden, bezeichnet man dabei als „gefloxt“ („*flanked by loxP*“) (Lewandoski, 2001).



► loxP (34bp) palindromische Sequenz (in schwarz, je 13bp) mit richtungsweisender asymmetrischer 8bp Kernsequenz (in rot):  $\overrightarrow{\text{ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT}}$

**Abbildung 5: Abhängig von Lage und Orientierung der loxP Stellen (schwarzes Dreieck) gibt es unterschiedliche Rekombinationsmöglichkeiten (Exzision, Inversion und Translokation).** Mit rot/rosa ist das Insert gekennzeichnet, das Genom mit blau. (A) Exzision und reverse Insertion: loxP Stellen sind gleichgerichtet; (B) Inversion: loxP Stellen sind gegensätzlich; (C) Translokation: loxP Stellen befinden sich auf verschiedenen DNA-Molekülen in gleicher Richtung (modifiziert nach (Metzger & Feil, 1999)).

Bei der Rekombination binden an die palindromische Sequenz der beiden loxP Erkennungsstellen jeweils zwei Cre-Monomere, wodurch die Synapsis, ein Rekombinationskomplex aus zwei loxP Stellen und vier Cre Molekülen durch Protein-Protein-Interaktion, entsteht (Mack et al., 1992). Durch nukleophilen Angriff des Tyrosin-Rests (Tyr<sub>324</sub>), unterstützt durch eine Aminosäuren-Tetrade bestehend aus den Aminosäureresten Arg212, His308, Arg311 (Guo et al., 1997; Nunes-Duby et al., 1998) und Lys172 (Cao & Hayes, 1999), zwischen der ersten und zweiten Base der 8bp langen *spacer* Region wird diese in einem Abstand von 6bp unter Ausbildung einer kovalenten 3'-Phosphotyrosin Verknüpfung geschnitten (Gopaul et al., 1998). Durch diese Bindung wird Energie gespeichert, so dass die Rekombination ohne energiereiche Kofaktoren erfolgen kann. Nach Strangaustausch der *top*-Stränge am 5'-Ende der *overlap*-Regionen und Ligation des 3'-Phosphotyrosins an das freie 5'-OH des Empfängerstranges bildet sich eine Holliday-Struktur als Zwischenprodukt (Gopaul et al., 1998). Dabei soll das Zwischenprodukt nicht durch klassische „*branch migration*“, sondern durch eine „*strand swapping*“ Isomerisierung entstehen (Nunes-Duby et al., 1995; Van Duyne, 2001). In diesem Modell kommt es zu einem Aufschmelzen von zwei bis drei Basenpaaren in der Spacerregion mit anschließender Kreuzung der Stränge in der Mitte des *overlap*-Bereiches und Religation der *top*-Stränge. Die Rekombination wird durch Strangbruch und anschließender Ligation der *bottom*-Stränge am 3'-Ende der *overlap*-Region unter

Auflösung des Intermediats vervollständigt (Van Duyne, 2001). Damit eine Rekombination stattfinden kann, ist ein Abstand der beiden loxP-Stellen von mind. 82bp notwendig.

#### *Dre/rox-Rekombinationssystem*

Das 2004 beschriebene Rekombinationssystem Dre/rox wurde von Sauer und McDermott bei der Sequenzierung der 7kb *immC* Region von vier P1 verwandten Phagen entdeckt (Sauer, McDermott 2004). Die Region wurde ausgewählt, da im selben Bereich des P1 Bakteriophagen auch die Cre-Rekombinase sowie deren Erkennungssequenzen loxP liegen. Die Region umfasst neben der *immC*, der Immunitätsregion von P1, die den C1 Repressor und weitere Immunitätsproteine codiert, auch die Gene für die Terminase und die *pac-site* für die DNA-Verpackung. Außerdem ist hier der Sitz des *ref*-Gens für die homologe Rekombination. Ausgewählt wurden die Bakteriophagen P1, P7, p15B, Φw39 und D6, weil sie alle λ-Integrasen exprimieren, zu denen auch die Rekombinationssysteme Cre/loxP und Flp/FRT gehören. Mit Ausnahme von D6 sind die entsprechenden Gene dieser Region nahezu identisch. D6 zeigte zwar die gleiche Genorganisation, aber die Aminosäuresequenzen der D6 Proteine unterschieden sich von denen der anderen. So zeigt die in D6 Phagen entdeckte 36kDa Rekombinase Dre nur 39% Gemeinsamkeiten mit Cre (Sauer, McDermott 2004). Dre rekombiniert die 32bp rox Erkennungsstellen (*region of crossover (x-over)*), bestehend aus einem 4bp langen, asymmetrischen *spacer* flankiert von zwei 14bp langen palindromischen DNA Sequenzen (Sauer, McDermott 2004). Dabei teilen sich rox und loxP identische Sequenzen mit Ausnahme der Spacerregion und einer 3bp langen Heterologie in der Mitte der palindromischen Sequenzen. Cre und Dre sind heterospezifisch, d.h. Cre katalysiert nicht die Rekombination der rox-sites und Dre nicht die der loxP-sites. Dies wurde durch die Ergebnisse von Stewart et al. 2009 durch Rekombinationsversuche beider Systeme in Form von Expressions-, wie auch Reportervektoren in *Escherichia coli* (*E. coli*), Säugertierzellen und Mäusen, sowie durch Liganden-induzierbare Systeme verifiziert (Anastassiadis et al., 2009).

#### **Konventionelle versus konditionale Genmanipulation**

Konventionelle *knockout*-Verfahren führen zur Inaktivierung eines Gens im Gesamtorganismus. Je nach Expressionszeitpunkt kann das fehlende Protein bereits in frühen Entwicklungsphasen dem Organismus nicht mehr zur Verfügung stehen.

Dies kann zu embryonaler oder früher postnataler Letalität im Falle von lebenswichtigen Genen (Friedel et al., 2011) oder auch zu einem veränderten Phänotyp im adulten Individuum aufgrund Kompensation durch andere Genprodukte und damit fehlgeleiteten Entwicklungsprozessen führen. Ebenso kann die Anwesenheit eines Selektionsmarkers zu ungewollten Phänotypveränderungen beitragen (Fiering et al., 1995). Bei einer Geninaktivierung im Gesamtorganismus sind auch oftmals keine Rückschlüsse auf die Proteinfunktion für ein bestimmtes Organ möglich.

Dies kann durch konditionale Strategien mit der Beschränkung der genetischen Modifikation auf einen bestimmten Lebensabschnitt oder einen bestimmten Zell- oder Gewebetyp durch den Einsatz sequenzspezifischer Rekombinationssysteme verhindert werden (Sauer, 1998; Metzger & Feil, 1999). Das grundlegende Prinzip des konditionalen Rekombinationssystems mittels gezielter Genveränderung (*gene targeting*) beruht in der Herstellung mehrerer Mauslinien. So wird für die Generierung eines konditionalen *knockouts* (gezielte Inaktivierung von endogenen Genen) üblicherweise ein essentieller Bereich des Zielgens von Rekombinationsstellen, wie z.B. den loxP-Stellen flankiert („gefloxt Mauslinie“), ohne die endogene Genexpression zu behindern. Dies wird oftmals durch das Platzieren der loxP Sequenzen in größere Introns oder außerhalb des Gens zum Beispiel in den 3'-untranslatierten Bereich erreicht. Durch Verpaarung mit einer zweiten sog. „Cre-transgenen“ Linie, welche die Cre-Rekombinase exprimiert, kommt es zur Rekombination und somit zu einer Geninaktivierung. Dadurch erfolgt der Funktionsverlust des Gens (*loss of function*) in sämtlichen Zellen, welche die Cre-Rekombinase exprimieren.

Zur Generierung eines konditionalen *knockin* (Insertion von Genen oder DNA-Fragmenten in einem bestimmten Locus) hingegen wird vor die codierende Sequenz des Zielgens eine loxP flankierte STOP-Kassette platziert oder bei bereits bestehendem *knockout* in einem Targetingvektor vor dem zu untersuchenden Gen eine gefloxt STOP-Kassette eingebracht, wodurch jeweils die Transkription verhindert wird. Erst durch Verpaarung mit einer Cre-transgenen Maus (z.B. „Cre-deleter Mauslinie“) wird die STOP-Kassette durch Rekombination entfernt, was die Expression des Zielgens bedingt.

Mit einem konditionalen sequenzspezifischen Rekombinationssystem kann die Expression der Rekombinase ubiquitär zur Etablierung von Nullmutanten (Sauer &



Henderson, 1988), gewebsspezifisch oder zeitlich induziert erfolgen (Orban et al., 1992; Kuhn et al., 1995; Schwenk et al., 1998; Utomo et al., 1999; Saunders, 2011).

Dabei ist die räumlich beschränkte Deletion des betreffenden Gens vor allem bei embryonaler oder perinataler Letalität des konventionellen *knockouts* von Bedeutung, da sonst eine postnatale Untersuchung der Genfunktion in vivo nicht möglich wäre. Etwa 14% bis 19% der murinen Gene haben einen letalen Phänotyp, da sie während der Embryogenese essentiell sind (Wilson et al., 2005). Für eine zelltyp- bzw. gewebsspezifische Rekombination wird die Expression der Rekombinase durch einen spezifischen Promotor eingegrenzt. Dabei bleibt in Zellen, welche die Rekombinase nicht exprimieren, der flankierte Locus unverändert, im Gegensatz zu Zellen, in denen die promotorbedingte Rekombination stattfindet. Der dieser Arbeit zugrunde liegende *knockout* steht unter dem Einfluß des p48-Promotors, der die pankreasspezifische Expression der Rekombinase bewirkt.

Auch eine zeitliche Kontrolle der Expression der Rekombinase ist durch deren Bindung an Liganden möglich (Logie & Stewart, 1995). Besonders bekannt sind Fusionsproteine der Cre-Rekombinase mit Ligandenbindedomänen mehrerer unterschiedlicher zytoplasmatischer Hormonrezeptoren, wie dem Östrogenrezeptor (Anastassiadis et al., 2010), dem Glukokortikoidrezeptor (Brocard et al., 1998) und dem Progesteronrezeptor (Mukherjee et al., 2006). Um zu verhindern, dass Fusionsproteine durch endogene Hormone aktiviert werden, wird die Gensequenz der Bindedomäne durch Mutationen derart verändert, dass eine Bindung und somit Aktivierung nicht mehr durch endogene, sondern nur durch synthetische Hormone erfolgt (Vegeto et al., 1992; Zhang et al., 1996; Anastassiadis et al., 2010). Die Fusion der Cre-Rekombinase mit einer mutierten Östrogenrezeptor-Ligandenbindedomäne am Carboxyterminus wurde bereits erfolgreich eingesetzt (Metzger et al., 1995; Feil et al., 1996; Feil et al., 1997). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Fusionsprotein DreERT2 wird die Dre-Rekombinase an die durch Tamoxifen induzierbare, zweifach mutierte Steroidbindedomäne ERT2 des humanen Östrogenrezeptors fusioniert. Diese erwies sich bereits in Form des CreERT2 Fusionsproteins als zehnfach sensitiver auf Hydroxytamoxifen als CreERT (Indra et al., 1999). Bei Abwesenheit von Tamoxifen befindet sich das Fusionsprotein, gebunden an Hitzeschockprotein HSP90, im Zytoplasma (Scherrer et al., 1993; Mattioni et al., 1994), wodurch der Transport in den Zellkern verhindert wird. Erst

nach Bindung des spezifischen Liganden Tamoxifen an die Hormonbindedomäne wird der Komplex durch eine Konformationsänderung und damit verbundener Freisetzung von HSP90 aktiviert und die Rekombinase kann in den Zellkern translozieren (Shi & Bassnett, 2007). Die Aktivierung erfolgt dabei nicht durch das endogene 17 $\beta$ -Östradiol, sondern nur durch das synthetische, nichtsteroidale Östrogenanalogon 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) (Feil et al., 1996; Metzger & Chambon, 2001).

### **2.1.3 Genloci**

Die Wahl eines geeigneten Genlokus zur Generierung transgener Tiere ist von mehreren Bedingungen abhängig. Dabei sollte nicht nur die Integrationseffizienz bei der homologen Rekombination hoch sein, sondern auch die Expression des Transgens ubiquitär erfolgen. Endogene Transkriptionsfaktoren können mit der Promotorsequenz interagieren und somit zu einer Änderung der Promotorstärke führen. Ferner ist zu berücksichtigen, dass die Integration des Transgens die Expression endogener Gene im Genlokus nicht beeinflusst, da es dadurch zu ungewollten phänotypischen Veränderungen kommen kann oder gar zu einer embryonalen Letalität.

Für die Generierung der transgenen Mäuse in dieser Arbeit mussten zwei Konstrukte, pROSA-roxSTOProx-Txnrd2-IresLacZ und pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2, in das Mausgenom integriert werden. Als Genloci dafür wurden der ROSA26- und der Hprt-Lokus gewählt, die für diesen Zweck besonders geeignet erschienen. Von diesen ist nicht nur bekannt, dass eine Integration mit hoher Effizienz gelingt, sondern auch, dass die Expression ubiquitär stattfindet.

#### **ROSA26 (R26)-Lokus**

Der ROSA26-Lokus (Gt(ROSA)26Sor) wurde von Friedrich und Soriano 1991 durch einen *gene trap screen* (Detektion von Genen mittels Genfalle) in murinen ES-Zellen mit einem retroviralen Vektor entdeckt (Friedrich & Soriano, 1991). Dieser Vektor, der namensgebend für den Lokus wurde (*r*reverse *o*rientation *s*plice *a*ccceptor (ROSA)), integrierte an mehreren Stellen. Jedoch exprimierte nur ein Klon, die Nummer 26,  $\beta$ geo ( $\beta$ -gal/Neomycinresistenz-Fusionsprotein) in allen Geweben der Mäuse, die aus den viral infizierten ES-Zellen generiert wurden. Zuerst wurde vermutet, dass es sich beim Lokus ROSA26 um ein *housekeeping* Gen handelt, aber es stellte sich heraus, dass der endogene Promotor drei Transkripte unbekannter Funktion, jedoch



keine Proteine codiert (Hohenstein et al., 2008). Der Locus, der sich auf dem Chromosom 6 befindet (Zambrowicz et al., 1997), ist für das *gene targeting* leicht zugänglich, was in einer hohen Integrationseffizienz in den ROSA26-Lokus durch homologe Rekombination resultiert (Soriano, 1999). Eine ubiquitäre Expression des Transgens durch den endogenen ROSA26-Promotor, wenn auch auf moderatem Niveau (Masui et al., 2005), konnte bereits mehrmals nachgewiesen werden (Zambrowicz et al., 1997; Soriano, 1999; Mao et al., 2001; Srinivas et al., 2001). Die Inaktivierung der ROSA26-Transkripte führte bei homozygot mutanten Mäusen nicht zu einem veränderten Phänotyp (Zambrowicz et al., 1997). Mit diesen Eigenschaften erwies sich der ROSA26-Lokus als besonders geeignet für eine Integration, da nicht nur die hohe Effizienz durch homologe Rekombination, sondern auch die ubiquitäre Expression, sowie die Abwesenheit eines abnormen Phänotyps wichtig waren. Zusätzlich gab es hier die Möglichkeit mit einem promotorlosen Targetingvektor zu arbeiten, dessen Gene nur nach dem Prinzip der *gene trap mutagenesis*, also der Integration eines promotorlosen Targetingvektors hinter einem endogenen Promotor, exprimiert werden. Dadurch ist es möglich, die Anzahl korrekt integrierter, selektionsresistenter Klone zu erhöhen (Smithies et al., 1985; Doetschman et al., 1988).

### **Hprt-Lokus**

Die gezielte Mutation spezifischer Genloci (*gene targeting*) wurde erstmals erfolgreich im Hprt-Lokus eingesetzt (Doetschman et al., 1987; Thomas & Capecchi, 1987; Thompson et al., 1989). Der Locus stellt dabei ein ideales Modellsystem zum *gene targeting* dar, da er X-chromosomal lokalisiert ist (Ensembl, 2012) und somit Zellen des Karyotyps XY hemizygot für das Hprt-Gen sind. Somit ruft die Mutation eines Allels bereits einen Aktivitätsverlust hervor. Die Expression des Hprt-Lokus ist ubiquitär (Bronson et al., 1996). Weil es sich um ein *housekeeping* Gen handelt (Caskey & Kruh, 1979), werden i.d.R. in den Lokus eingefügte transgene Promotoren durch die offene Chromatinanordnung in ihrem Expressionspotential nicht eingeschränkt und zusätzlich rekombinieren Targetingvektoren homolog mit hoher Effizienz (Bronson et al., 1996).

Das Hprt-Gen selbst kann als Selektionsmarker für die homologe Rekombination verwendet werden. Bei Mutationen, die eine Rekonstitution des Gens bewirken, erfolgt die Selektion durch Zugabe des HAT-Mediums (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin Medium) und bei einer Nullmutation des Hprt-Lokus durch Zugabe von 6-

Thioguanin (Doetschman et al., 1988). Dabei führt ein mutationsbedingter Funktionsverlust des Gens zu einem Ausfall des Enzyms Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT). Dies führt beim Menschen pathophysiologisch zum Lesch-Nyhan-Syndrom (Kuehn et al., 1987; Nyhan & Wong, 1996). Bei Mäusen gibt es keinen entsprechenden klinischen Phänotyp (Elsea & Lucas, 2002), jedoch lässt sich der Ausfall wie im Folgenden beschrieben biochemisch nutzen. Das Enzym ist neben der Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT) ein wichtiger Bestandteil des *purin salvage pathways*. Es dient der Bildung von Mononukleotiden aus den freien Purinbasen Guanin und Hypoxanthin, bei der unter Abspaltung von Pyrophosphat ein Ribosephosphat aus Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) auf die freie Purinbase übertragen wird, sowie dem Abbau von Harnsäure. Diesen *pathway* macht man sich bei der Selektion der Hprt-Klone durch die Verwendung von 6-Thioguanin (6-TG) zunutze (Stout & Caskey, 1985). 6-TG ist ein Analogon der Nukleinbase Guanin und gehört in die Gruppe der Thiopurine. Es konkurriert mit Hypoxanthin und Guanin um das Enzym HPRT und inhibiert somit die Purin-Biosynthese. Durch den Einbau des toxischen Guaninanalogs 6-TG wird die Nukleinsäuresynthese gehemmt und Zellen mit intaktem Hprt-Gen sterben. Durch die homologe Rekombination des in dieser Arbeit verwendeten Transgens in das Exon 3 des Hprt-Lokus ist jedoch die Expression von Hprt unterbunden. Somit sind die Zellen nicht in der Lage Guanin zum Aufbau von Guanosintriphosphat zu verwenden. Aufgrund dieser Funktionsstörung wird 6-TG nicht als Guaninanalogon verwertet und guaninhaltige Nukleotide werden neu synthetisiert (*de novo* Synthese). Dadurch überleben Zellen mit funktionslosen Hprt-Lokus die Selektion (sog. Komplementationsstrategie).

#### **2.1.4 Homologe Rekombination**

Natürlicherweise dient die homologe Rekombination der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität durch die Reparatur von DNA-Schäden wie Doppelstrangbrüchen, sowie der genetischen Variabilität durch Austausch von DNA-Sequenzen. Beim Gentransfer wird die homologe Rekombination zur gezielten Veränderung bestimmter Genorte durch Integration einer Einzelkopie eines Transgens in murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) genutzt (Thomas & Capecchi, 1987; Capecchi, 1989a). Dies bietet nicht nur die Möglichkeit die Kopienzahl zu kontrollieren, sondern auch das Transgen in chromatinkompatible Regionen mit einer gewünschten entwicklungs- und gewebsspezifischen Expression

zu integrieren sowie insertionsbedingte Mutagenese an zufälligen Stellen des Wirtsgenoms, die zu Veränderungen des Phänotyps führen kann, zu verhindern (Bronson et al., 1996).

Methodisch erfolgt die homologe Rekombination durch Elektroporation eines linearisierten Targetingvektors in ES-Zellen, der auf beiden Seiten Sequenzhomologien zum Zielgen enthält. Durch Rekombination der homologen Bereiche gelangt das Transgen zielgerichtet in den ausgewählten Locus. Da dieser Vorgang nur in etwa einer von  $10^5$  bis  $10^6$  Zellen stattfindet (Melton, 2002) und Zufallsintegrationen weitaus häufiger vorkommen (Vasquez et al., 2001), müssen Zellklone auf das gewünschte Ereignis hin selektioniert werden. Dies geschieht durch Positiv-Negativselektion, also einer Kombination aus zwei Selektionsmarkern, bei der sich der Positive (z.B. Neomycin-Phosphotransferase II; neo) innerhalb und der Negative (z. B. Diphtherietoxin A Fragment; DTA) außerhalb des homologen Bereichs befindet (Doetschman et al., 1988; Mccarrick et al., 1993; Araki et al., 2006).

### **2.1.5 Transgenintegration**

Zur Erzeugung eines genetisch veränderten Organismus ist es notwendig, das Transgen in das Genom einzubringen. Bei der Maus bieten sich dabei die im Folgenden beschriebenen zwei Entwicklungsstadien an. Dabei unterscheidet man bei der Transgenintegration in das Wirtsgenom zwischen nicht-homologer (zufälliger) und homologer (zielgerichteter) Rekombination.

#### ***Vorkerninjektion (Pronukleusinjektion)***

Zum einen ist es möglich, Fremd-DNA in den Vorkern, meist den größeren männlichen Vorkern, direkt nach der Befruchtung (0,5dpc) zu injizieren, solange die beiden Vorkerne noch nicht miteinander verschmolzen sind (Gordon et al., 1980; Palmiter & Brinster, 1986). Dabei wird die DNA zu 10-30% in das Genom eingebaut. Der Vorteil der Pronukleusinjektion liegt in der schnellen Erzeugung von transgenen Tieren, doch der Nachteil ist die zufällige Integration von häufig mehreren hintereinander geschalteten Einzelkopien (*tandem multicopy arrays*). Das Transgen kann dabei durch den Einfluß des benachbarten Chromatins, wie auch durch superhelikale Destabilisation in seiner Expressionseffizienz beeinflusst werden (Positionseffekt; (Sershen et al., 2011)) oder Wirtsgene können durch das inserierte Transgen inaktiviert werden (Integrationsmutanten), so dass es zu einer Verminderung oder gar Verhinderung der Genexpression in Säugetierzellen durch

das Konkatemer kommt (Garrick et al., 1998; Henikoff, 1998)). Somit können in einem Transgenprojekt in den erstellten verschiedenen transgenen Linien aufgrund unterschiedlicher Integrationsorte und Kopienzahlen verschiedene Phänotypen entstehen (Meisler, 1992), was die Erzeugung und Untersuchung mehrerer transgener Linien erforderlich macht.

### ***Blastozysteninjektion***

Ein zweites murines Entwicklungsstadium, das der Blastozyste, wird immer häufiger für die Herstellung transgener Mäuse genutzt, da mittels dieser Technologie ein Genlokus durch homologe Rekombination gezielt verändert werden kann (*gene targeting*). Die homologe Rekombination wird dabei in embryonalen Stammzellen vorgenommen.

Die Blastozyste (3,5dpc) besteht aus der äusseren Hülle (Zona pellucida), der äusseren Zellschicht (Trophoblast), der inneren Zellmasse (inner cell mass (ICM), Embryoblast), deren Zellen sich am embryonalen Pol der Blastozyste konzentrieren und der Blastozystenhöhle (Blastocoel). Die Blastozyste schlüpft während der Weiterentwicklung aus der Zona pellucida und nistet sich in das Uterusgewebe ein, wo die weitere Embryogenese stattfindet. Während sich aus dem Trophoblast die Plazenta entwickelt, bildet sich aus der ICM der Embryo.

Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) gewinnt man aus der ICM der Blastozyste (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Es handelt sich dabei um pluripotente, selbsterneuernde und undifferenzierte Zellen, die isoliert und über lange Zeiträume in Kultur genommen werden können (Evans & Kaufman, 1981). Sie besitzen die Fähigkeit, sich in alle Gewebe, die von den drei Keimblättern (Ekto-, Meso- und Endoderm) abgeleitet sind, nicht jedoch in extraembryonale Zelltypen zu differenzieren (Bradley et al., 1984; Suda et al., 1987). Die ES-Zellen behalten ihre Pluripotenz in vitro durch die Zugabe von LIF (*leukemia inhibitory factor*), das die Differenzierung von ES-Zellen inhibiert oder durch Cokultur mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs, Feederzellen, *feeders*) (Williams et al., 1988; Ponchio et al., 2000; Niwa et al., 2009). Die murinen ES-Zellen sind in der Lage, nach Kultivierung, Elektroporation eines linearisierten Targetingvektors und anschließender Injektion in Blastozysten zur Bildung von Zellen der Keimbahn der Maus beizutragen (Gossler et al., 1986; Bradley et al., 1992).

Im Gegensatz zur Vorkerninjektion bietet die homologe Rekombination in ES-Zellen zwar den Vorteil einer gerichteten Integration einer Einzelkopie des Transgens in

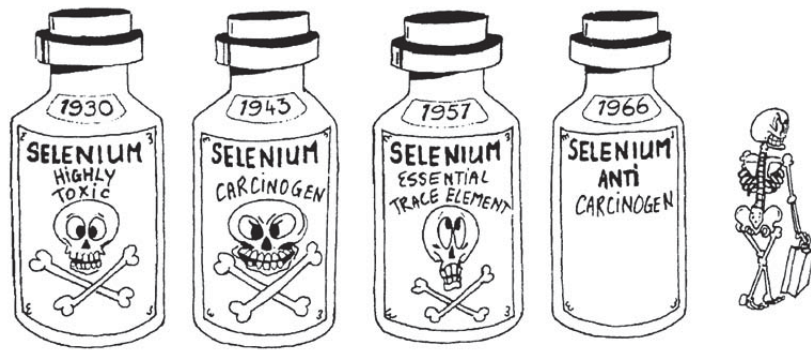
einem zuvor gewählten Genort, jedoch besteht der Nachteil dieser Methode neben dem hohen Arbeits- und Zeitaufwand in der geringen Effizienz der homologen Rekombination.

## **2.2 Selen**

### **2.2.1 Geschichte und Bedeutung des Selens**

#### ***Geschichte des Selens***

1817 entdeckte der schwedische Chemiker Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) auf der Suche nach der Ursache von Vergiftungserscheinungen von Arbeitern einer Gripsholmer Schwefelfabrik, bei der anfänglich eine Arsenkontamination vermutet wurde, ein bis dato unbekanntes chemisches Element. Er nannte es Selen (Se) nach der griechischen Mondgöttin Selene. Selenvergiftungen von Mensch und Tier, ausgelöst durch die Aufnahme von selenhaltigen Pflanzen, wie z.B. *Astragalus* sp. (Neuhierl et al., 1999), ließen Selen lange Zeit als rein toxisches Element erscheinen. 1957 zeigten jedoch Schwarz und Foltz durch einen Selen-depletierten Fütterungsversuch, bei dem Ratten eine Lebernekrose entwickelten (Schwarz & Foltz, 1999), dass es sich bei Selen um ein essentielles Spurenelement handelt. Mit der Entdeckung der Glutathionperoxidase als wichtigem Schutzenzym vor oxidativem Stress, die Selen in Form der 21. Aminosäure Selenocystein im katalytischen Zentrum enthält, konnte 1973 die Notwendigkeit der Zufuhr von Selen und dessen immunmodulierende Wirkung erklärt werden (Flohe et al., 1973; Rotruck et al., 1973). In den folgenden Jahren wurden dem Selen u.a. antikarzinogene und chemo-präventive Effekte zugeschrieben (Combs & Gray, 1998) (Abbildung 6). Heutzutage wird es zur Krebsprophylaxe eingesetzt (Almondes et al., 2010). In Chemotherapien erhöht Selen die Strahlensensibilität von Tumorzellen bei gleichzeitigem Schutz des gesunden Gewebes (Rodemann et al., 1999).



**Abbildung 6: Entwicklung der Bedeutung des Selen im Verlauf des 20. Jahrhunderts.** Zu Beginn noch als gefährliches Toxin angesehen wandelt sich der Ruf des Selen über das eines Karzinogens zu einem essentiellen Spurenelement hin zu einem antikarzinogen wirkenden Nahrungssupplement (Vernie, 1984).

### **Selenvergiftungen**

Selenvergiftungen wurden bereits im 13ten Jahrhundert von Marco Polo beschrieben. Bei seinen Lasttieren traten nach Verzehr einer unbekannten asiatischen Pflanze Übelkeit, Hufaufweichung und Haarverlust und damit die Anzeichen einer Selenvergiftung (sog. Selenose) auf. Bei Tieren wird dies als Alkali- oder Taumelkrankheit (*alkali disease*, *blind staggers*) bezeichnet (O'toole & Raisbeck, 1995). Dabei sind Ausschüen und Haarverlust durch den Austausch des Schwefelatoms durch ein Selenatom in schwefelhaltigen Aminosäuren bedingt, die als Baustein im Keratin vorhanden sind (Stashak, 1989).

Beim Menschen sind Selenvergiftungen sehr selten und beschränken sich auf Einzelfälle (Wilber, 1980), z.B. durch die Verbrennung selenhaltiger Kohle in häuslichen Feuerstellen. Die Symptome äußern sich in Atembeschwerden, gastrointestinalen Verätzungen, nach Knoblauch riechender Atemluft (verursacht durch flüchtige Komponenten der Entgiftung, v.a. Dimethylselenid), Deformation und Verlust der Nägel, Haarausfall und kardiovaskuläre Dysrhythmie (Barceloux, 1999; Vinceti et al., 2001). Die empfohlene Menge der täglichen Selenzufuhr liegt für Erwachsene bei 30-70µg (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.; DGE, 2012), jedoch sollte das obere Toleranzlevel von 300µg pro Tag nicht überschritten werden (Alexander, 2007).



**Selenmangel**

Ein Selenmangel ist veterinärmedizinisch als sog. „*white muscle disease*“ bei Weidetieren von Bedeutung, die sich in Myodystrophie, Lähmungen und plötzlichen Todesfällen äußert (Ge & Yang, 1993).

Beim Menschen gibt es spezifische Krankheitsbilder, bei denen ein Selenmangel ursächlich ist. Die „*Keshan disease*“ ist eine endemische, juvenile Kardiomyopathie (Litov & Combs, 1991; Burke & Opeskin, 2002), die in China v.a. in Gebieten auftritt, deren Böden Se-arm sind (Ge et al., 1983). Dabei kommt es zur Herzinsuffizienz aufgrund einer Herzdilatation mit multifokalen Myokardnekrosen und fibrotischem Umbau (Ge & Yang, 1993). Als prädispositioneller Faktor der Erkrankung wird neben einem manifesten Se-Mangel eine Co-Infektion mit dem Cocksackie-Virus (CVB3/0) angenommen (Beck et al., 2003). Dabei schließt man aus Experimenten mit Se-arm ernährten Nagetieren, dass aufgrund des Se-Mangels das Immunsystem geschwächt wird und durch eine erhöhte Konzentration von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) der ursprünglich avirulente Virusstamm zu einer virulenten Form mutiert. Die Selensupplementation ermöglicht zwar ein Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern, jedoch sind bereits vorhandene Veränderungen nicht reversibel. Selenoproteine spielen bei der Erkrankung offenbar ebenfalls eine entscheidende Rolle. In einem *knockout*-Modell der zytosolischen Glutathion-Peroxidase (GPx1) zeigte sich, dass die Mäuse durch reine Infektion mit dem benignen Stamm des Cocksackievirus auch bei adäquater Selensupplementation die Erkrankung entwickelten (Moghadaszadeh & Beggs, 2006). Ebenfalls konnte in einem Thioredoxinreduktase 2-*knockout* eine dilatative Kardiomyopathie festgestellt werden (Conrad et al., 2004).

Eine weitere Erkrankung ist die „*Kashin-Beck disease*“, die sich durch eine Osteoarthropathie und Chondrodystrophie auszeichnet (Litov & Combs, 1991). Neben einem Selenmangel wird dabei auch eine Unterversorgung mit Jod, Getreidekontamination durch Mykotoxine, wie auch eine Trinkwasserverschmutzung vermutet (Sudre & Mathieu, 2001). Kombierter Selen- und Jodmangel resultiert in einem myxomatösen Kretinismus mit stark beeinträchtigter körperlicher wie auch geistiger Entwicklung (Zimmermann & Kohrle, 2002; Kohrle & Gartner, 2009).

### 2.2.2 Selenoproteine

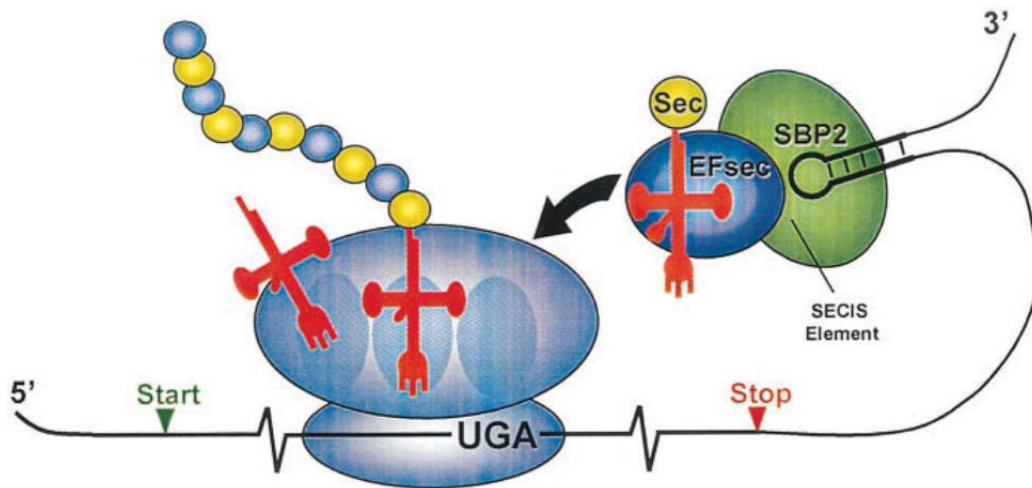
Selen ist als aktives Zentrum in Form der 21. Aminosäure Selenocystein (Sec) wichtiger Bestandteil von redox-aktiv wirkenden Enzymen, den sog. Selenoproteinen. Die Aufgaben der Selenoproteine sind u.a. Verringerung von Sauerstoffradikalen und somit des oxidativen Stresses, Förderung von Wachstum und Metabolismus, wie auch der Beitrag zur Spermienreifung und –motilität. Das humane Selenoproteom besteht aus 25 Selenoproteinen (Alexander, 2007; Lu & Holmgren, 2009), die Maus besitzt 24 Genorte für die Codierung von Selenoproteinen (Kryukov et al., 2003).

#### **Selenproteinmetabolismus**

Das Nukleotid-Triplett UGA wird beim Selenoproteinmetabolismus nicht wie üblicherweise als Stop-, sondern als Selenocystein-Codon abgelesen (Chambers et al., 1986; Bock et al., 1991) und führt damit zur Inkorporation von Selen in Form von Selenocystein (Bock et al., 1991; Stadtman, 1996).

Anders als bei den übrigen 20 Aminosäuren dient bei der Biosynthese der Selenoproteine eine bereits durch die Seryl-tRNA-Synthetase mit einem Serin (Ser) beladene tRNA als Vorlage (Fletcher et al., 2001). Durch Modifikation der tRNA mit Selenophosphat, synthetisiert aus Selenid und Adenosintriphosphat (ATP) durch die Selenophosphat-Synthetase 2, kommt es zur Konversion zur Selenocysteyl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> (Sec tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>) (Stadtman, 1996). Dabei wird durch die Selenocystein-Synthetase der Austausch der endständigen Hydroxylgruppe durch die Selenylgruppe katalysiert (Hatfield & Gladyshev, 2002). Die Transkription der Selenoproteine erfolgt in Abhängigkeit einer Haarnadelstruktur im 3' untranslatierten Bereich der mRNA, die als „*Selenocysteine insertion sequence*“ (SECIS)–Element bezeichnet wird und zwingend notwendig ist für das Erkennen von UGA als Sec-Codon (Fletcher et al., 2001). Dieses Element wird durch das „SECIS-binding protein 2“ (SBP 2) erkannt und gebunden und formt einen Komplex mit einem Sec-spezifischen Elongationsfaktor (EF<sub>sec</sub>) (Turanov et al., 2011). Durch EF<sub>sec</sub> wird die Sec tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> zum Ribosom dirigiert und es erfolgt die Insertion von Sec in die wachsende Peptidkette am Selenocystein-Codon UGA (Abbildung 7). Dabei wird der normale Elongationsfaktor (EF-Tu) verdrängt und die Bindung von Terminationsfaktoren an UGA verhindert. Bei Se-Mangel wird das UGA-Codon als Translationsterminationssignal erkannt und es folgt der Abbau der mRNA (sog. *nonsense-mediated decay*, NMD) (Hatfield & Gladyshev, 2002).





**Abbildung 7: Insertionsmechanismus von Selenocystein (Sec) in Selenoproteine.** Die Sec-beladene Sec tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> (in rot mit Sec in gelb) wird als Komplex mit EFsec (in blau), SBP2 (in grün) und dem SECIS-Element (Haarnadelstruktur) an das Ribosom gebunden (ebenfalls in blau). Das UGA-Codon dient dabei als Selenocystein- und nicht wie üblicherweise als Stop-Codon und dadurch erfolgt die Insertion von Sec in die wachsende Peptidkette (gelb/blau) (Hatfield & Gladyshev, 2002).

Insgesamt wurden durch <sup>75</sup>Se-Markierung in vivo über 30 Selenoproteine entdeckt (Hawkes et al., 1985; Evenson & Sunde, 1988), von denen 15 näher charakterisiert sind (Brown & Arthur, 2001). Die Bedeutung der Selenoproteine wird durch einen *knockout* des Gens für die tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> deutlich, bei dem es im homozygoten Zustand zu einer embryonalen Letalität (um den Embryonaltag E6,5) aufgrund fehlender Selenoproteine kommt (Bosl et al., 1997).

Die Funktion vieler Selenoproteine ist immer noch unklar. Die am besten charakterisierten Selenoproteine gehören der Familie der Thioredoxinreduktasen, der Glutathionperoxidasen und der Dejodinasen an (Lu & Holmgren, 2009) (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Biochemische Funktion der Selenoproteinfamilien Thioredoxinreduktase, Glutathionperoxidase und Dejodinase** (modifiziert nach (Moghadaszadeh & Beggs, 2006; Lu & Holmgren, 2009)).

Familie	Enzym (Lokalisation)	Funktion
Glutathionperoxidasen (GPxs)	Zytosolische oder klassische GPx (GPx1) (ubiquitär)	Antioxidanz: Reduktion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und organischen Hydroperoxiden
	Gastrointestinale GPx (GPx2) (Gastrointestinaltrakt)	
	Plasma GPx (GPx3) (Plasma und Niere)	
	Phospholipid-Hydroperoxid GPx (GPx4, PHGPx) (ubiquitär; 3 Formen: zytosolisch, mitochondrial, spermienkernspezifisch)	Antioxidanz: Reduktion von Phospholipid- und Cholesterolhydroperoxidase Spermatogenese
	Riechepithel GPx (GPx6)	unbekannt

<b>Dejodinasen (DIOs)</b>	DIO1 (v.a. Leber, Niere, Schilddrüse)	Aktivierung des Prohormons Thyroxin (T <sub>4</sub> ) zu T <sub>3</sub>
	DIO2 (v.a. Gehirn, Hypophyse, Schilddrüse, Skelettmuskulatur, braunes Fettgewebe)	
	DIO3 (v.a. Großhirnrinde, Haut, Plazenta)	Inaktivierung von T <sub>4</sub> und T <sub>3</sub> zu rT <sub>3</sub> bzw. zu 3,3'-T <sub>2</sub>
<b>Thioredoxinreduktasen (Txnrds; TrxRs)</b>	Zytosolische/nukleäre Txnr1 (ubiquitär)	NADPH-abhängige Reduktion von oxidiertem Thioredoxin
	Mitochondriale Txnr2 (ubiquitär)	
	Zytosolische Txnr3 (Hoden)	Reduktion von Thioredoxin und Glutathion

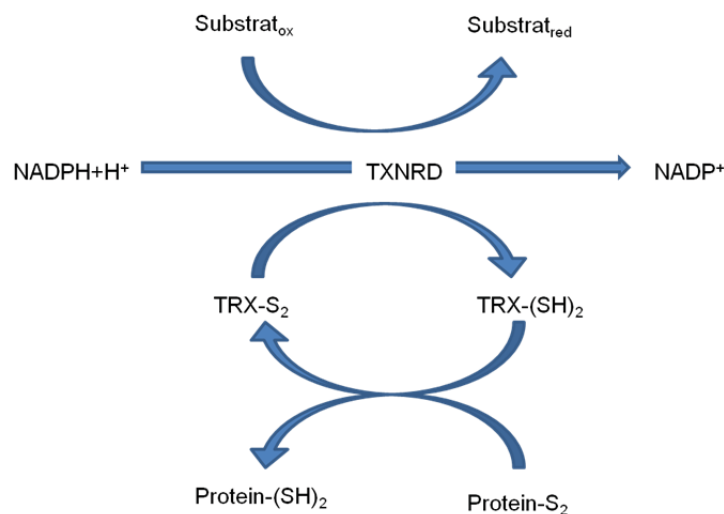
### 2.2.3 Thioredoxinreduktase

Da in dieser Arbeit ein genetischer *rescue* eines pankreasspezifischen *knockouts* der mitochondrialen Thioredoxinreduktase generiert wurde, soll nachfolgend das Thioredoxin System, bestehend aus NADPH, Thioredoxinreduktase und Thioredoxin näher erläutert werden (Holmgren, 1985).

Bei den Thioredoxinreduktasen (TXNRDs) handelt es sich um Selenoproteine von denen drei Vertreter bekannt sind, nämlich die zytosolische TXNRD1 und die mitochondriale TXNRD2, welche beide ubiquitär sind, sowie die hodenspezifische TXNRD3. Mit einer Masse von ~56kDa (Sun et al., 2001) bilden die Thioredoxinreduktasen Homodimere, die aus zwei identischen Monomeren zusammengesetzt sind. Diese dimerischen Flavoenzyme (Gromer et al., 1998) gehören der Familie der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen an (Arner, 2009). Jedes Monomer besteht dabei aus einer FAD-prosthetischen Gruppe und einer NADPH-Bindedomäne. Zusätzlich gibt es zwei redoxaktive Zentren, von denen das eine N-terminal lokalisiert ist (-Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-) und das andere C-terminal (Gly-Cys-Sec-Gly) (Gromer et al., 2003). Dadurch ergibt sich ein redox-aktives Enzymsystem als wichtiger Bestandteil der Redoxregulation (Nakamura et al., 1997; Nakamura, 2004).

Oxidativer Stress ist auf ein Ungleichgewicht von Produktion und Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) zurückzuführen und damit Folge einer gestörten Redox-Homöostase. Die ROS entstehen physiologisch v.a. als Nebenprodukt der Atmungskette und bedingen durch deren Akkumulation u.a. Lipidperoxidation, Proteinperoxidation und DNA-Schädigung.

Bei der Regulation des zellulären Redoxmilieus ist das Hauptsubstrat Thioredoxin (TRX), ein wichtiger Bestandteil des Thioredoxin-Systems (Arner & Holmgren, 2000). Isoformen von TRX sind ~12kDa große Dithiole (S-S) (Sun et al., 2001; Arner, 2009) mit einem konservierten aktiven Zentrum (Cys-Gly-Pro-Cys) (Matsui et al., 1996). Die TRX1 befindet sich im Zytosol und die TRX2 in Mitochondrien. Zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase reduzieren sie eine große Anzahl an reaktiven Sauerstoff-Verbindungen. Oxidiertes Thioredoxin wiederum wird reversibel durch NADPH und die Thioredoxinreduktase reduziert und damit reaktiviert (Patenaude et al., 2004). Dabei bindet NADPH an den N-Terminus der Thioredoxinreduktase und überträgt die Elektronen auf die enzymgebundene FAD Gruppe (Biterova et al., 2005), wodurch es zur Reduktion der Cystein-Reste kommt. Durch die *head-to-tail* Anordnung des Enzyms werden die Elektronen vom N-Terminus auf die C-terminalen Cystein- und Selenocystein (Sec) -Reste zur späteren Reduzierung von Proteinen übertragen (Arner, 2009) (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase System.** Schematische Darstellung der Reduktion der Disulfide des oxidierten Thioredoxin (TRX-S<sub>2</sub>) zu TRX-(SH)<sub>2</sub> durch die Thioredoxinreduktase (TXNRD) und NADPH. TRX-(SH)<sub>2</sub> reduziert Proteindisulfide durch Oxidoreduktaseaktivität, wodurch es selbst oxidiert wird (TRX-S<sub>2</sub>) (modifiziert nach (Arner & Holmgren, 2000)).

### **Bedeutung der Thioredoxinreduktasen 1 und 2**

Die Gensequenz der mitochondrialen Thioredoxinreduktase befindet sich beim Menschen auf Chromosom 22q11.2 (Miranda-Vizuete et al., 1999b) und bei der Maus auf Chromosom 16 (Miranda-Vizuete et al., 1999a; Kawai et al., 2000). Die

Nukleotidsequenz der 57kDa großen *Txnrd2* (Miranda-Vizuete et al., 1999a) besitzt eine nur 54%ige Homologie zu der von *Txnrd1* (Gasdaska et al., 1999; Lee et al., 1999), bedingt durch das zusätzliche mitochondriale Importsignal der *Txnrd2* am N-Terminus (Miranda-Vizuete et al., 1999b). Die Proteinsequenzen der murinen Thioredoxine 1 und 2 sind zu 72% identisch. Durch *knockout*-Mausmodelle wurde die Bedeutung beider Thioredoxine erforscht.

Homozygot mutante Embryonen eines generellen *Txnrd1-knockouts* sind nicht überlebensfähig und sterben etwa am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung (E9,5) (Matsui et al., 1996; Jakupoglu et al., 2005). Es konnten hochgradige Störungen in der Organogenese nachgewiesen werden, die nach Tag E8,5 auftraten.

Conrad und Mitarbeiter konnten bei einem generellen *Txnrd2-knockout* Mausmodell ebenfalls eine embryonale Letalität bei homozygot mutanten Tieren (E13.0) feststellen (Conrad et al., 2004). Die *Txnrd2*-defizienten Embryonen waren in ihrer Entwicklung retardiert und anämisch. Zum besseren Verständnis dieser Entwicklungsstörung wurde ein herzspezifischer *Txnrd2-knockout* generiert, der eine perinatale Letalität der Tiere durch biventrikuläre dilatative Kardiomyopathie bedingte (Conrad et al., 2004). Ein pankreasspezifisches *knockout*-Modell der *Txnrd2* zeigte eine spontan entstehende akute Pankreaserkrankung ab der 4. Lebenswoche, die sich zu einer schwerwiegenden chronischen Verlaufsform mit Entzündung und voranschreitender Atrophie des Pankreasgewebes bei einem Jahr alten Tieren entwickelte (Aichler, 2007).

Diese Arbeit hat zum Ziel, einen genetischen *rescue* der mitochondrialen Thioredoxinreduktase in diesem pankreasspezifischen *Txnrd2-knockout* zu generieren, um mögliche Veränderungen oder gar die Reversibilität des Phänotyps durch eine induzierte *Txnrd2*-Expression beurteilen zu können.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

1-Butanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1Kb DNA Extension Ladder (Invitrogen™)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
2-Mercaptoethanol	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
6-Thioguanine (6-TG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Agarose	Biolabproducts GmbH, Göttingen, Deutschland
Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Blasticidin S-Hydrochlorid <i>BioChemika</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
BSA ( <i>ImmunO Bovine Albumin Cohn FrV-Powder (Heat Shock)</i> ; bovines Serumalbumin)	MP-Biomedicals, LLC, Eschwege, Deutschland

## Material

Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Chlorwasserstoff (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
dH <sub>2</sub> O	Milli-Q (destilliert, demineralisiert und entionisiert), Helmholtz Zentrum München
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
DMEM (high Glucose)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA (Ethyldiamin-tetraessigsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ESGRO® ( <i>Murine Leukemia Inhibitory Factor</i> , LIF)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolute	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidium bromide solution (500µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
FKS (fötales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich (IDG3.2-Zelllinie)  PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland (MIA PaCa-2-Zelllinie)
G418-BC (Genitacin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (Invitrogen™)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gelatin solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

## Material

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Geneticin® Selective Antibiotic (G418 Sulfate) (50mg/ml)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
GIBCO® PBS	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
MEM Nonessential amino acids	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol (ES-Zellkultur)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Na-Citrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nonidet® P40 Substitute	Fluka Chemica-Biochemica, Neu-Ulm Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pen/Strep-Pre-Mix (P/S)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Potassium hexacyanoferrate (II)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Potassium hexacyanoferrate (III)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Roti®-Load 1 Ladepuffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Phenol/C/I (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1) (40% Acrylamidlösung)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
S.O.C. Medium (Invitrogen™)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
SDS Pellets (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland



Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Spermidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Taq DNA Polymerase (Invitrogen™)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
TE-Puffer (1x) pH 8,0	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA Lösung (0,05%/0,02%)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween 20	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
X-Gal	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

### 3.2 Enzyme

Cre-Rekombinase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
Finnzymes Phire Hot Start II DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PfuUltra™ II Fusion HS DNA	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Proteinase K (20mg/ml)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
rAPid Alkaline Phosphatase	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Restriktionsendonukleasen (exkl. PfoI, FspAI)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
Restriktionsendonukleasen (PfoI, FspAI)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
RNaseA	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland

### 3.3 Lösungen und Puffer

1% Agaroselösung	100ml 1x TBE 1g Agarose
10x TBE	890mM Tris Base 890mM Borsäure 20mM EDTA pH 8,0 in dH <sub>2</sub> O, pH 8,3 verdünnen auf 1x mit dH <sub>2</sub> O
1x TBST-Puffer (pH 7,6)	1,21g 10mM Tris Base (pH 8,0) 8,77g 150mM NaCl auf 1000ml mit dH <sub>2</sub> O 500µl 0,05% Tween 20
20x SSC	3M NaCl 0,3M Na-Citrat (pH 7,0)
5x Elektrophorese Puffer	15,1g 25nM Tris 94g 250nM Glycin (pH 8.3) 50ml 0,01% (w/v) SDS auf 1000ml mit dH <sub>2</sub> O verdünnen auf 1x mit dH <sub>2</sub> O
5x KCM-Puffer	2,5ml 2M KCl 1,5ml 1M CaCl <sub>2</sub> 2,5ml 1M MgCl <sub>2</sub> 3,5ml dH <sub>2</sub> O
Denaturierungspuffer	1,5M NaCl 0,5M NaOH

## Material

DNA-Lysispuffer	5ml 1M Tris Base (pH 8,5) 0,5ml 0,5M EDTA 20µl 2M HCl 0,5ml 20% SDS 2,5ml 4M NaCl 41,25ml dH <sub>2</sub> O 250µl Proteinase K (Zugabe vor Gebrauch)
Hybridisierungspuffer	0,5M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,2) 0,5M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,2) 7% SDS 1mM EDTA (pH 8,0)
IP-Puffer	50mM HEPES 150mM NaCl 1mM EDTA 0,5% Triton X 100 10% Glycerol in dH <sub>2</sub> O, pH 7,9
LacZ-Färbelösung	7,05ml LacZ Waschpuffer 0.3ml X-Gal (25mg/ml gelöst in N,N-Dimethylformamid) 75µl 500mM Potassium hexacyanoferrate (II) 75µl 500mM Potassium hexacyanoferrate (III)
LacZ-Waschpuffer	48,9ml PBS 100µl 1M MgCl <sub>2</sub> 500µl 1% Sodium deoxycholate 500µl 2% NP-40
Lysispuffer ( <i>tails</i> )	10mM Tris HCl (pH 7,6) 10mM EDTA (pH 8,0) 0,5% SDS 10mM NaCl 200µg/ml Proteinase K (Zugabe vor Gebrauch)
Neutralisationspuffer	1M Tris HCl (pH 7,5) 0,5M NaCl
Semi-dry Puffer	5,82g 48mM Tris Base 2,93g 39mM Glycin 3,7ml 0,037% SDS 200ml 20% Methanol auf 1000ml mit dH <sub>2</sub> O

Stripping-Puffer (pH 6,7)	3,57ml 100mM 2-Mercaptoethanol 50ml 20% SDS 31,25ml 1M Tris Base auf 500ml mit dH <sub>2</sub> O
TE-Puffer	10mM Tris HCl (pH 8,0) 1mM EDTA
Waschpuffer	1x SSC 0,1% SDS

### 3.4 Bakterien/Zelllinien und Zellkulturmedien

#### Bakterien/Zelllinien

BDF1	Dr. Ralf Kühn, IDG, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
IDG3.2	Dr. Ralf Kühn, IDG, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
MIA PaCa-2	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
<i>One Shot® Stbl3™ Chemically Competent E. coli</i>	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
P141PPT2	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland

#### Zellkulturmedien

##### Medien für die MIA PaCa-2 Zelllinie

Kulturmedium	DMEM 10% FKS
Selektivmedium	DMEM 10% FKS 1% P/S Blasticidin (10µg/ml) bzw. G 418-BC (1mg/ml)
Einfriermedium	DMEM 20% FKS 10% DMSO
Auftaumedium	DMEM 20% FKS

**Medien für die IDG3.2 ES-Zelllinie**

<b>Kulturmedium</b>	500ml DMEM (high glucose) 75ml FKS 9ml L-Glutamin (200mM) 12ml Hepes (1M) 6ml MEM Nonessential amino acids (100x) 1,2ml Mercaptoethanol (50mM) 90µl LIF (10 <sup>7</sup> U/ml)
<b>Einfriermedium</b>	Kulturmedium 20% FKS 10% DMSO

**3.5 Verbrauchsmaterialien und Kits**

3MM-CHR (Filterpapier)	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
8er-Softstrips (0,2ml) (PCR-Tube)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Amersham Hybond Blotting Paper (Filterpapier)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Amersham Hybond-N+ (Nitrozellulosemembran)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Amersham Hyperfilm <sup>TM</sup> ECL (Röntgenfilm)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Amersham Rediprime II DNA Labeling System	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Amersham <sup>TM</sup> ECL <sup>TM</sup> Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Chirurgische Einmalskalpelle	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
CryoTubes <sup>TM</sup>	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
CytoOne Cell Scraper (Zellschaber)	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Effectene Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Einmalküvetten Plastibrand® 1,5ml semi-micro	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Elektroporationsküvetten, 4mm	Bio-Rad Laboratories, München

## Material

EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Gefäße™	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain	BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA
illustra MicroSpin Columns	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
In Situ β-Galactosidase Staining Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Kodak BioMax MS Film	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
Optitran BA-S85 Nitrocellulose Membrane (Nitrozellulosemembran)	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Plattierungsspatel	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Primer/Sonden	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Quick Blunting Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
Quick Ligation Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
Sterile Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenausen, Deutschland
TaqMan Universal Master Mix II with UNG	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Venor® GeM OneStep	Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland
Zellkulturmaterialien (Petrischalen, Flaschen)	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland

### 3.6 Materialien für Klonierung

#### Vektoren

pBlueScript SK+ (2958bp) (Ampicillin-Resistenz) (Stratagene)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
pcDNA <sup>TM</sup> 6.2/EmGFP-Bsd/V5-DEST (8,1kb); (Invitrogen <sup>TM</sup> ) (Ampicillin-/Kanamycin-Resistenz)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO® Vektor (2580bp); (Invitrogen <sup>TM</sup> ) (Kanamycin-Resistenz)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

#### Linker/Plasmide-ROSA26

Zur Verfügung gestellte Linker/Plasmide:

Plasmid	Größe (bp)	Bezug
pEntr-MCS-IresLacZ	7041	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
pMC442- <i>Txnrd2</i> -IRES-puro	10091	Dr. Markus Conrad, Helmholtz Zentrum München (IDG)
pEntr-roxSTOProx-MCS	5652	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
RosaRFA	11581	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
pBroad-LacZ	7529	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)

Klonierte Plasmide:

Plasmid	Größe (bp)	Modifikation
pEntr-MCS-IresLacZ-dPacI	7040	Deletion der PacI Schnittstelle von pEntr-MCS-IresLacZ durch PacI-Verdau → erforderlich für spätere Linearisierung des Targetingvektors
pEntr- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ	9046	Ligation von <i>Txnrd2</i> aus pMC442- <i>Txnrd2</i> -IRES-puro (verdaut mit EcoRI und SnaBI) mit pEntr-MCS-IresLacZ-dPacI (verdaut mit FspAI)
pEntr-roxSTOProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ	11408	Ligation von <i>Txnrd2</i> -IresLacZ aus pEntr- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ (verdaut mit AscI und AatII) mit pEntr-roxSTOProx-MCS (verdaut mit AscI und AatII)
<b>Targetingvektor</b> pROSA-roxSTOProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ	18790	Klonase Reaktion zwischen rosaRFA und pEntr-roxSTOProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ
pEntr-rox- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ	8820	Entfernung der STOP-Kassette aus dem Plasmid pEntr-roxSTOProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ mit BstEII und NotI
pcDNA6.2-rox- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ	11772	Klonase Reaktion von pEntr-rox- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ mit pcDNA6.2/EmGFP-Bsd/V5-DEST-Vektor

pEntr-rox-LacZ	6331	Entfernung der STOP- <i>Txnrd2</i> -Ires-Kassette aus dem Plasmid pEntr-roxSTOProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ mit XmaI und AgeI
pcDNA6.2-rox-LacZ	9283	Klonase Reaktion von pEntr-rox-LacZ mit pcDNA6.2/EmGFP-Bsd/V5-DEST-Vektor
pcDNA6.2-roxSTOPprox- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ	14360	Klonase Reaktion von pEntr-roxSTOPprox- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ mit pcDNA6.2/EmGFP-Bsd/V5-DEST-Vektor

## Linker/Plasmide-Hprt

Zur Verfügung gestellte Linker/Plasmide:

Linker/Plasmid	Größe (bp)	Bezug	Sequenz
pEntr-STOP-FRT-MCS	5615	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)	
BstEII-lox-SmaI-Linker	49	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)	GTTACCATAACTTCGTATAG CATACATTATACGAAGTTAT CACGTGCCC
SacI-BsiWI-AgeI-Ascl-Linker	26	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)	GAGCTCCGTACGACCGGTG GCGCGCC
XhoI-SbfI-Sall-AvrII-SmaI-lox-EcoRI-Linker	66	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)	TCGAA CCTGCAGG GTCGAC CCTAGG CCCGGG ATAACTTCGTATAGCATACA TTATACGAAGTTAT G
pCAGGs-Dre	7495	Dr. Francis Stewart, BioInnovationsZentrum, Technische Universität Dresden	
pEntr-MCS-Blue	2703	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)	
pBlueskript-ERT2	3869	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)	
pDTA-Hprt	17756	Dr. Kosuke Yusa, Wellcome Trust Sanger Institute	
Ascl-NcoI-P <sub>HPRT</sub> (Primerbindungss- telle P <sub>HPRT</sub> in den kurzen Arm von pDTA-Hprt- CAGGS- loxSTOPloxDreE RT2)	42	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)	CGCGCCCATGGACAAAACG GTAACATTTAACTGCTCTAC ATA



*Klonierte Plasmide:*

Plasmid	Größe (bp)	Modifikation
pEntr-STOP-lox-MCS	5616	Ligation von pEntr-EcoRI-STOP-FRT-MCS (verdaut mit BstEII und SmaI) mit BstEII-lox-SmaI-Linker
pEntr-STOP-lox-MCS-dPmeI	5598	Deletion der PmeI Schnittstelle von pEntr-STOP-lox-MCS durch SmaI- und PmeI-Verdau → erforderlich für spätere Linearisierung des Targetingvektors
pEntr-STOP-lox-MCS-BsiWI	5604	Ligation von pEntr-STOP-lox-MCS-dPmeI (verdaut mit SacI und AscI) mit SacI-BsiWI-AgeI-AscI-Linker
pEntr-loxSTOPlox-MCS	5506	Ligation von pEntr-STOP-MCS-lox-BsiWI (verdaut mit XhoI und EcoRI) mit XhoI-SbfI-Sall-AvrII-SmaI-lox-EcoRI-Linker
pEntr-Dre	3756	Ligation der Dre-PCR mit pEntr-MCS-Blue
pBlueskript-DreERT2	4907	Ligation von Dre (verdaut mit PspOMI und XhoI) mit pBlueskript-XhoI-ERT2 (verdaut mit PspOMI und XhoI)
pEntr-loxSTOPlox-DreERT2	7511	Ligation von DreERT2 aus pBlueskript-DreERT2 (verdaut mit PfoI) mit pEntr-loxSTOPlox-MCS (verdaut mit PfoI)
pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2	9127	Ligation von CAGGs aus pCAGGs-Dre (verdaut mit Sall-HF und XbaI) mit pEntr-loxSTOPlox-DreERT2 (verdaut mit Sall-HF und AvrII)
<b>Targetingvektor</b> pHPRT-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2	18514	Ligation von CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 aus pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 (verdaut mit SbfI (sticky end) und Eco53kI (blunt end)) in pDTA-HPRT (verdaut mit NsiI und BsiWI)
pEntr-CAGGs-lox-DreERT2	6893	Entfernung der STOP-Kassette durch in vitro Inkubation mit Cre-Rekombinase
pDTA-P <sub>Hprt</sub> -Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2	18556	Einklonierung der Primerbindungsstelle P <sub>Hprt</sub> durch den Linker AscI-NcoI-P <sub>Hprt</sub> in die AscI-Schnittstelle von pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 vor dem kurzen homologen Arm

**Oligonukleotide**

Name	Größe (bp)	Sequenz 5'-3'	Bezug
BrpA-kurz-sc-UP	23	CGCTTTCTTGCTGTCCAA TTTCT	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
BrpA-LP	36	TAAATACAGCATAGCAA AACTTTAACCTCCAAATC	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
BrpA-UP	32	CTAGAAAGCTCGCTTTCTT GCTGTCCAATTCT	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)

CAGGs-Dre3	20	TGCTGTTCCCTCCTATCC AC	EMMA-The European Mouse Mutant Archive, Helmholtz Zentrum München (IEG), Deutschland
CAGGs-Dre4	20	CGGAGTCCATCAGCCTA GAG	EMMA-The European Mouse Mutant Archive, Helmholtz Zentrum München (IEG), Deutschland
CAGGs-sc-UP4	18	GTTCGGCTTCTGGCGTG T	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
CAG-sc-LP1	29	GTA CTTGGCATATGATAC ACTTGATGTAC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
CAG-sc-LP2	26	CTAGTCAATAATCAATGT CGACCTGC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
CAG-sc-LP3	28	CGTCAATTTTACGCAGAC TATCTTTCTA	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
CAG-sc-LP4	28	CTAGTCAATAATCAATGT CGACCTGCAT	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Dre-LP	29	CTCGAGGGAGTCCATCA GCCTAGAGTTGG	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
Dre-sc-LP3	20	CCAGGCTCACAGACTTGT CA	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Dre-UP	31	GGGCCCTCCCGGACCAT GGGTGCTAGCGAGC	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
DTA-sc-UP2	22	TGTAAAACGACGGCCAG TGAGC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
FSFneoNcoLP	22	GCATCGCCATGGGTCAC GACGA	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
Hprt-ES-sc-UP1	30	AAAACGGTAACATTTAAC TGCTCTACATAC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Hprt-ES-sc-UP2	32	ACAAAACGGTAACATTTA ACTGCTCTACATAC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Hprt-sc-LP1	29	CTAGAAAGATAATCATAT TGTGACGTACG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Hprt-sc-LP2	25	CCTGTCCATAATCAGTCC ATGAGGA	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Hprt-sc-UP1	25	GCTGACCTGCTGGATTAC ATTAACC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
M13-FP	18	TGTAAAACGACGGCCAG T	GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland
M13-RP	18	CAGGAAACAGCTATGAC C	GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland
pBroad-5268-LP	26	CCAAGGTTTGAAGTAGCT CTTCATTT	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)

pGL3-pA-Pause-UP	28	TGAATAGTTAATTGGAGC GGCCGCAATA	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
ROSA-26-Prom- UP3	24	CCTAAAGAAGAGGCTGT GCTTTGG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
ROS-ES-LP1	29	GGAGCCTGCTTTTTTGT CAAACCTTGTGA	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
ROS-ES-UP1	21	CTTGGTGCGTTTGC GGG GATG	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
ROS-ES-UP2	27	GCTCCTCAGAGAGCCTC GGCTAGGTAG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Soriano-SA-LP	24	CATCAAGGAAACCCTGG ACTACTG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
TetOcre1	20	ACCAGCCAGCTATCAACT CG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
TetOcre2	17	TTACATTGGTCCAGCCAC C	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
TetOcre3	24	CTAGGCCACAGAATTGAA AGATCT	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
TetOcre4	25	GTAGGTGGAAATTCTAGC ATCATCC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
TR2E10	26	GATCCTCCCAAGTGACCT GCAGCTGG	Dr. Michaela Aichler, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
TR3flox1	25	CAGGTCAGTAGGCTGTA GAGTTTGC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
TR3flox2	26	ATGTCCCAGTGTACTTAT GATGAATC	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

## Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden durchgeführt von der Firma GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland.

### 3.7 Materialien für Western Blot

Polyacrylamid-Trenngel (10%)	
40% Acrylamidlösung	5,0ml
1,5M Tris (pH 8,8)	5,0ml
10% SDS	0,2ml
10% APS	0,2ml
TEMED	8,0µl
dH <sub>2</sub> O	9,6ml

Sammelgel (5%)	
40% Acrylamidlösung	0,62ml
1,0M Tris (pH 6,8)	0,63ml
10% SDS	0,05ml
10% APS	0,05ml
TEMED	5,0µl
dH <sub>2</sub> O	3,6ml

Antikörper (AK)	Verwendung, Bezug
anti-TR2 "1C4"	Monoklonaler Ratten-Antikörper (-AK) gegen den C-Terminus von <i>Txnrd2</i> (VKLHISKRSGLEPTVTG), 1:50 verdünnt; Dr. Markus Conrad, Helmholtz Zentrum München (IDG) (Sibbing et al., 2011)
anti-rat IgG (Anti-rat IgG, HRP-linked Antibody #7077)	Polyklonaler AK aus Ziege gegen Ratten-IgG, HRP-konjugiert, sekundärer AK für Western Blot, 1:10.000 verdünnt; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
anti-FLAG (Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse)	Monoklonaler Maus-AK gegen das FLAG-Epitop (DYKDDDDK), 1:1.000 verdünnt; Dr. Markus Conrad, Helmholtz Zentrum München (IDG)
anti-mouse IgG (ECL mouse IgG, HRP-linked whole antibody (from sheep))	Polyklonaler AK aus Schaf gegen Maus-IgG, HRP-konjugiert, sekundärer AK für Western Blot, 1:10.000 verdünnt; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

### 3.8 Materialien für TaqMan

TaqMan-Primer&Sonden	Sequenz 5'-3'	Bezug
bAct-DNA-Taq-fw-mouse	TTCAACACCCCAGCCATGTA (20bp)	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
bAct-DNA-Taq-rev-mouse	TGTGGTACGACCAGAGGCATAC (22bp)	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
bAct-DNA-Sonde	FAM-TAGCCATCCAGGCTGTG CTGTCCC-BHQ1 (24bp)	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
neo-Tm-UP1	TGGATTGCACGCAGGTTCT (19bp)	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
neo-TM-LP1	GTGCCCAGTCATAGCCGAAT (20bp)	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)
neo-TM-Sonde	FAM-CGGCCGCTTGGGTG GAGAGG-BHQ1 (20bp)	Dr. Dieter Saur, Klinikum rechts der Isar (TUM)

### 3.9 Materialien für Southern Blot

Primerpaare entnommen aus (Yusa et al., 2011).

Primer für die Herstellung der 5'-Sonde (Hprt-Lokus)	
Forward Primer	GCTTTAATGATTTTGCTGTACTTTTTCTG
Reverse Primer	TGATCCTTTACAACTCAAACCTAG
Primer für die Herstellung der 3'-Sonde (Hprt-Lokus)	
Forward Primer	CTTTTAATCATCAGTTTTCTGATTTAATAC
Reverse Primer	CAAATTATTAGATATAAGCTATAAG

### Radioaktive Isotope

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dCTP (3000 mCi/mmol, 10 mCi/ml)	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
---	----------------------------------

### 3.10 Maushaltung

IVC-System Greenline	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Labortiereinstreu	Lignocel ¾, Rettenmeier, Rosenberg, Deutschland
Mausdiät	Altromin 1314, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland

### 3.11 Transgene Mauslinien

<i>Txnrd2<sup>fl/fl</sup></i> ; <i>Ptf1a-Cre<sup>tg/wt</sup></i>	Dr. Markus Brielmeier, Helmholtz Zentrum München
CAGGs-Dre ( <a href="http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&amp;id=MGI:4367446">http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WI Fetch?page=alleleDetail&amp;id=MGI:4367446</a> ; 08.07.2012)	EMMA, Helmholtz Zentrum München

### 3.12 Geräte

Avanti™J-25 Kühlzentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Axiovert 25 (Mikroskop)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene) (Cryocontainer)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Elektrophoresis Power Supply Consort	BiocomDirect, Bridge of Weir, UK
EL-vollautomatischer Laborautoklav (Typ: 2540EL)	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Filmkassetten	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg, Deutschland
Geigerzähler LB122	Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Bad Wildbad, Deutschland
Geldokumentation Modell P 2000-50 Vilber Lourmat	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gene Pulser Xcell™ Electroporation System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Hybridisierungssofen Hybrid 2000	H. Saur Laborbedarf, Reutigen, Deutschland
Inkubator (Brutschrank)	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Inverses Mikroskop Leica DM IL	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
LAUDA Aqualine AL12 (Wasserbad)	Lauda Dr. R. Wobser GmbH&Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Liquid scintillation counter (Szintillationszähler)	Hidex, Turku, Finnland
Milli-Q <sup>UFPlus</sup> Aufbereitungsanlage	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
PerfectBlue Semi-Dry Elektrophoret	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Photo-Print Video-Geldokumentationssystem	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Power supply E861	Consort bvba, Turnhout, Belgium
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
SmartSpec <sup>TM</sup> Plus Spektrophotometer	BioRad GmbH, München, Deutschland
Stemi SV11 (Mikroskop)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
StepOnePlus <sup>TM</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Thermomixer 5436 (Heizblock)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermoshake (Inkubatorschüttler)	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland
Tischentwicklungsmaschine „Curix 60“	Agfa HealthCare GmbH, Bonn, Deutschland
TPersonalThermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

### 3.13 Software

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/</a> (25.06.2012)
NEBcutter V2.0	<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/">http://tools.neb.com/NEBcutter2/</a> (25.06.2012)
Plasmapper	<a href="http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/">http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/</a> (25.06.2012)
Primer Express® Software v2.0 (Applied Biosystems)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
ReadSeq.pl v. 1.2	<a href="http://www0.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/readseq.pl">http://www0.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/readseq.pl</a> (25.06.2012)



## 4 Methoden

### 4.1 Klonierung

#### 4.1.1 Enzymatischer Restriktionsverdau mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die als „molekulare Scheren“ DNA-Moleküle an spezifischen Nukleotidsequenzen schneiden. Bakterien entwickelten damit ein Schutzsystem vor viralen Infektionen durch Bakteriophagen, indem sie enzymatisch die nicht-methylierte Fremd-DNA zerschneiden und ihre eigene DNA durch Methylierung vor dem Abbau schützen. Für einen Einsatz in der Klonierung sind nur Restriktionsenzyme geeignet, die als Endonukleasen sequenzspezifisch die DNA hydrolysieren. Das Schneiden kann gerade (glatte oder stumpfe Enden, engl. *blunt ends*) oder versetzt (überhängende oder klebrige Enden, engl. *sticky ends*) erfolgen (Abbildung 9). Eine Ligation (enzymkatalysierte Verknüpfung) zweier DNA-Segmente kommt leichter durch klebrige Enden zustande.

Glatte Enden (*blunt ends*):



Überhängende Enden (*sticky ends*):

5'-Überhang



3'-Überhang



( | zeigt die Schnittposition des Restriktionsenzym an)

**Abbildung 9: Glatte und überhängende Enden durch Restriktionsverdau.** Entstehung glatter Enden am Beispiel des Restriktionsverdau mit *SmaI* und überhängender Enden am Beispiel des Restriktionsverdau mit *EcoRI* (5'-Überhang) bzw. *PvuI* (3'-Überhang).

Für die Neukombination von Plasmiden, wie auch für die Prüfung klonierter Plasmide wurde ein enzymatischer Restriktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen unterscheiden sich in ihrer Erkennungssequenz, die aus Palindromen mit einer Länge von 4 bis 6bp bestehen, sowie den jeweils optimalen Reaktionsbedingungen. Die Restriktionsenzyme werden zusammen mit der Ziel-DNA in den mitgelieferten Puffern und der für die Inkubation empfohlenen Temperatur (meist bei 37°C) über

Nacht im Thermocycler mit anschließender Hitzeinaktivierung (meist 65°C für 20min) laut Herstellerangaben verdaut. Optional wurde dem Ansatz BSA (Bovines Serumalbumin) (100µg/ml) zugegeben (Tabelle 2). Nach dem Verdau wurden die DNA-Fragmente über Gelelektrophorese und die Plasmide zusätzlich durch kommerzielle Sequenzierung überprüft.

**Tabelle 2: Ansatz für einen Restriktionsverdau.**

DNA (bis zu 1µg)	2µl
NEB-Puffer (10x)	2,5µl
Enzym	1µl
BSA (10x)	2,5µl
dH <sub>2</sub> O	17µl
Gesamtvolumen	25µl

#### 4.1.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Durch Entfernung der 5'-Phosphatgruppe von Restriktionsfragmenten mit der *rAPid Alkaline Phosphatase* direkt im Anschluss an einen enzymatisch katalysierten Verdau wurde eine Religation von Vektorfragmenten für die anschließende Ligation verhindert. Die Inkubation erfolgte für 30min bei 37°C bei anschließender Hitzeinaktivierung bei 75°C für 5min in einem Thermocycler (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Reaktionsansatz für Dephosphorylierung.**

Vektor-DNA (bis zu 1µg)	17µl
rAPid Alkaline Phosphatase Buffer (10x)	2µl
rAPid Alkaline Phosphatase	1µl
Gesamtvolumen	20µl

#### 4.1.3 Herstellung von *blunt ends*

Durch die Verwendung des *Quick Blunting Kits* wurden inkompatible 5'- oder 3'-Überhänge eines Restriktionsfragments aufgefüllt und am 5'-Ende phosphoryliert. Diese Modifikation war bei der Klonierung unumgänglich, wenn durch geeignete Restriktionsendonukleasen auf einer oder beiden Seiten keine komplementären *sticky ends* für die folgende Ligation erzeugt werden konnten. Die Auffüllung geschah mit Hilfe der T4 DNA Polymerase, die sowohl eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, als

auch eine 5'→3'-Polymeraseaktivität besitzt. Die Inkubation erfolgte bei 22°C für 15min bei anschließender Hitzeinaktivierung bei 70°C für 10min (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Reaktionsansatz zur Herstellung glatter Enden (*blunt ends*).**

DNA (bis zu 5µg)	10µl
Blunting Buffer (10x)	2,5µl
2xdNTPs	5µl
Blunt Enzyme Mix	1µl
dH <sub>2</sub> O	6,5µl
Gesamtvolumen	25µl

#### 4.1.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Zur Umpufferung wie auch zur Entfernung von DNA-Fragmenten wurde eine Säulchenaufreinigung bzw. ein präparatives Gel genutzt.

##### ***Aufreinigung von DNA aus Lösungen – Die Säulchenaufreinigung***

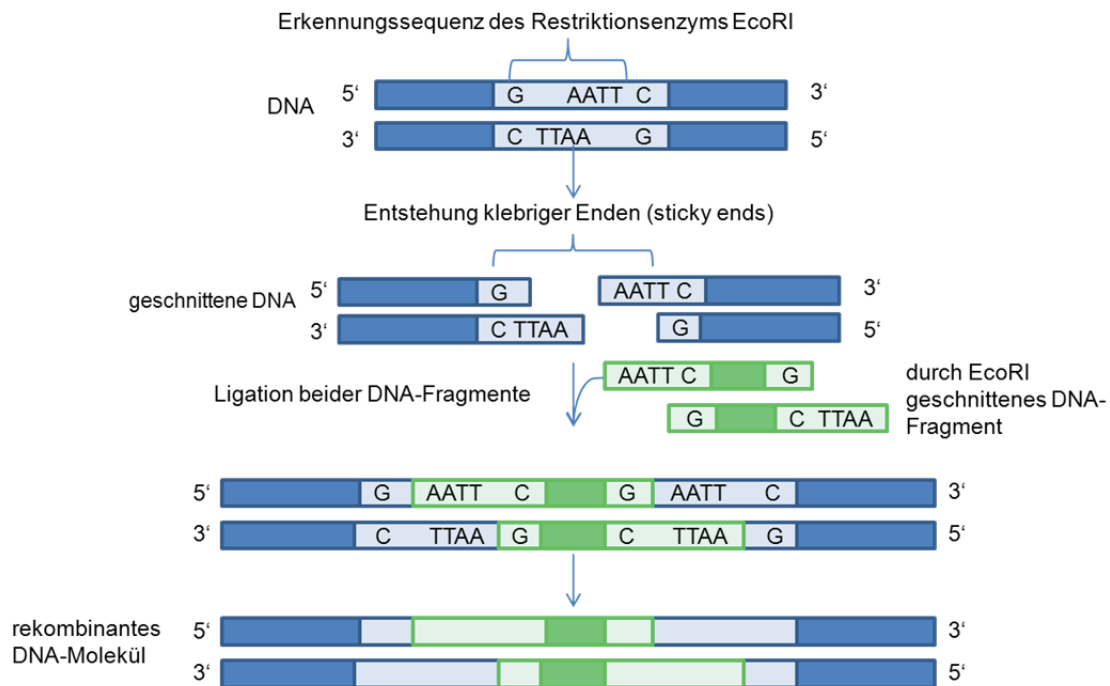
Für eine Umpufferung oder zur Entfernung von Enzym oder kleineren Plasmidfragmenten bis zu einer Größe von 100bp wurde eine chromatografische Aufreinigung über ein kommerzielles DNA-Aufreinigungssäulchen (*Qiaquick PCR Purification Kit*) nach Herstellerangaben durchgeführt.

##### ***Aufreinigung von DNA durch präparative Gelelektrophorese und Gelextraktion***

Zur Entfernung von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel wurde ein 0,8%iges Gel ohne Zugabe von Ethidiumbromid verwendet. Zur Detektion der Fragmente wurde das *GelStar<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain* benutzt. Nach 1:100 Verdünnung des *GelStar* Stocks mit DMSO wurden 120µl des Restriktionsansatzes, indem bis zu 30µg DNA eingesetzt wurden, mit 20µl Ladepuffer (6x *DNA Loading Dye*) und 15µl des verdünnten *GelStar* gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurden 1,5µl *GelStar* Verdünnung mit 2µl 2-Log DNA Standard mit 8µl dH<sub>2</sub>O und 2µl Ladepuffer versetzt. Nach drei Stunden bei 80V in einer Gelelektrophoresekammer wurden die DNA-Fragmente mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und für die folgende Gelextraktion das *Qiaquick Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben verwendet.

### 4.1.5 Ligation

DNA-Ligasen sind Enzyme, die die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der freien 5'-Phosphatgruppe des einzufügenden Fragments (Insert) mit der 3'-Hydroxylgruppe des aufzunehmenden Elements (Vektor) unter Wasserabspaltung katalysieren (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Ligrationsreaktion von *sticky end* Fragmenten nach Restriktionsverdau am Beispiel des Restriktionsenzym EcoRI.**

Die Verbindung zweier Restriktionsfragmente erfolgte durch das *Quick Ligation Kit*. Für eine hohe Ligationseffizienz wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 verwendet und auf 10µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Dann wurden laut Herstellerangaben 10µl *Quick Ligation Buffer* und 1µl T4 DNA Ligase zugegeben (Tabelle 5). Die Ligation erfolgte bei 22°C über Nacht. Für eine anschließende Transformation wurden 5µl des Ligrationsansatzes verwendet.

**Tabelle 5: Reaktionsansatz für die Ligation.**

Vektor (30fmol)	2µl
Insert (90fmol)	6µl
Quick Ligation Buffer (2x)	10µl
T4 DNA Ligase	1µl
dH <sub>2</sub> O	2µl
Gesamtvolumen	21µl

#### 4.1.6 Transformation von kompetenten Stbl3-Bakterien

##### **Kompetente Stbl3 Bakterien**

In dieser Arbeit wurden chemokompetente *One Shot Stbl3 E. coli* verwendet, die sich durch eine hohe Transformationseffizienz von  $>1 \times 10^8$  koloniebildenden Einheiten/ $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA auszeichnen. Die Bakterien wurden bis zur Transformation aliquotiert bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Kultivierung dieser erfolgte in LB (*lysogeny broth*)-Medium (10g LB-Medium gelöst in 400ml  $\text{dH}_2\text{O}$  mit anschließender Autoklavierung bei  $121^\circ\text{C}$  und 2bar) unter aeroben Bedingungen bei  $25^\circ\text{C}$  unter Schütteln bei 180rpm in einem Inkubationsschüttler (Thermoshake). Zur Selektion transformierter und plasmidtragender Bakterien wurden diese auf Agarplatten (16g LB-Agar gelöst in 400ml  $\text{dH}_2\text{O}$  mit anschließender Autoklavierung bei  $121^\circ\text{C}$  und 2bar) mit einem Plattierungsspatel ausgestrichen. Die Agarplatten enthalten zur Selektion der Klone einen Antibiotikazusatz, indem nach Abkühlung das je nach Plasmidresistenz entsprechende Antibiotikum dem noch flüssigen Agar zugegeben (Ampicillin:  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  oder Kanamycin:  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und dann in sterile Petrischalen gegossen wurde. Nur Bakterien, die das Plasmid aufgenommen und damit die Resistenz erworben hatten, überlebten die Selektion. Die weitere Anzucht erfolgte in Selektivmedium (LB-Medium versetzt mit  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin bzw.  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin). Die Agarplatten, wie auch das LB-Medium wurden luftdicht verschlossen bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die transformierten Bakterien wurden als Glycerinkultur ( $500\mu\text{l}$  Bakteriensuspension und  $400\mu\text{l}$  Glycerol) bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

##### **Transformation mittels KCM-Methode**

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von rekombinanter DNA in kompetente Bakterien. Als Kompetenz wird die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet, Fremd-DNA aufzunehmen und diese an Tochterzellen weiterzugeben. Kompetenz erlangen Bakterien z.B. durch Calciumchlorid-Behandlung und anschließenden Hitzeschock oder Elektroporation. In dieser Arbeit wurde eine chemische Transformation mittels KCM- (Kalium-, Calcium-, Magnesiumchlorid) Methode durchgeführt. Für die Transformation wurden die kompetenten Stbl3 Bakterien auf Eis aufgetaut. Bis zu  $10\text{ng}$  DNA und  $20\mu\text{l}$  5xKCM wurden mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf ein Gesamtvolumen von  $100\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach vorsichtigem Einrühren von  $100\mu\text{l}$  Bakterien mit der Pipettenspitze erfolgte eine Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  für 20min und anschließend bei Raumtemperatur (RT) für 10min. Nach Zugabe von  $0,8\text{ml}$  S.O.C.

Medium wurden die Bakterien für zwei Stunden bei 25°C horizontal bei 180rpm im Thermoshake geschüttelt. Danach wurden 50µl der Suspension auf eine antibiotikahaltige Agarplatte ausplattiert und die restliche Suspension bei 2.000rpm in der Eppendorf Zentrifuge für 2min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das verbliebene Bakterienpellet mit 100µl S.O.C. Medium resuspendiert. Davon wurden 50µl auf eine weitere antibiotikahaltige Agarplatte ausplattiert. Der Rest der Bakteriensuspension wurde bei 4°C gelagert. Die Anzucht der Bakterieneinzelkolonien auf den Agarplatten erfolgte bei 25°C im Brutschrank über Nacht.

#### **4.1.7 Überprüfung (Screen) transformierter Bakterien**

Während der Kultivierung in S.O.C. Medium exprimieren plasmidtragende Bakterien das Kanamycin- oder Ampicillin-Resistenzgen. Nach Anzucht auf den antibiotikahaltigen Agarplatten erfolgte die Selektion der resistenten Bakterien in Form von Einzelkolonien, die durch eine PCR auf korrekt integrierte Plasmid-DNA überprüft wurden. Dabei erfolgte die Überprüfung der Einzelkolonien je nach Wahrscheinlichkeit der erfolgreichen Transformation auf zwei Wegen. Bei hoher Wahrscheinlichkeit der Plasmidaufnahme wurden von den Agarplatten bis zu sechs Einzelkolonien gepickt. Von diesen wurde direkt eine Plasmidpräparation durchgeführt, die Plasmid-DNA per PCR geprüft und nur die Plasmide der PCR-positiven Klone weiter verwendet. Für den Fall, dass der Erfolg der Transformation unsicher war, wurden zunächst bis zu 48 Einzelkolonien von den Agarplatten gepickt, diese direkt per PCR gescreent und auf einer sog. „Pickplatte“ weiter kultiviert. Nur die PCR-positiven Klone wurden anschließend im Selektivmedium weiter angezüchtet und daraus die Plasmidpräparation durchgeführt.

#### ***Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction; PCR)***

Die PCR stellt eine wichtige Methode zur in vitro Amplifikation von DNA dar. Die PCR besteht aus drei Schritten, die sich in mehreren Zyklen wiederholen. Zuerst wird die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt, um die Stränge durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zu trennen (Denaturierung). Als nächstes werden die Oligonukleotid-Primer spezifisch an den zu amplifizierenden DNA-Strang (Matrize, engl. *Template*) als Startpunkte der PCR komplementär an die Einzelstränge gebunden, indem die Temperatur etwa 2-3°C unter dem Schmelzpunkt der Primer gesenkt wird (i.d.R. zwischen 50°C und 65°C) (Annealing). Der finale Schritt besteht

in der Anlagerung von freien Nukleotiden ans 3'-Ende des angelagerten Primers durch die Polymerase (Elongation). Je nach verwendeter Polymerase liegt der optimale Temperaturbereich zwischen 68°C und 72°C. Die Dauer der Elongation ist von der bp-Länge der zu amplifizierenden DNA abhängig. Bei selbst erstellten Primern wurden die Oligonukleotide so konstruiert, dass sie etwa eine Länge von 25bp hatten, keine repetitiven Elemente enthielten und am 3'-Ende zwei bis drei Purinbasen vorhanden waren. Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Protokolle werden in den jeweiligen Abschnitten beschrieben.

Dre wurde durch PCR für die Klonierung amplifiziert (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Reaktionsbedingungen zur Amplifikation von Dre.**

Ansatz	Dre-UP	2,5µl
	Dre-LP	2,5µl
	10xPuffer	5,0µl
	2xdNTPs	5,0µl
	DNA	2,4µl
	PfuUltra <sup>TM</sup> II-Polymerase	2,0µl
	dH <sub>2</sub> O	30,6µl
	Gesamtvolumen	50µl
Bedingungen	94°C 3min	19 Zyklen, Δdt 3
	94°C 30sek	
	58°C 40sek	
	72°C 90sek	
	72°C 4min	
	25°C Pause	

### **Screen-PCR der resistenten Einzelkolonien**

Für eine Überprüfung von Bakterien wurden bis zu 48 Klone mit einem sterilen Holzstäbchen abgelöst („gepickt“). Nach Abstreifen des Holzstäbchens in ein PCR-Reaktionsgefäß (PCR-Tube) für die anschließende Screen-PCR wurde das restliche Zellmaterial zur weiteren Anzucht und Isolierung der Einzelklone auf eine in Felder unterteilte, antibiotikahaltige Agarplatte („Pickplatte“) ausgestrichen. Diese Platte wurde für weitere 8-10 Stunden bei 25°C in einem Inkubator bebrütet. In den PCR-Tubes wurde das Zellmaterial mit jeweils 50µl dH<sub>2</sub>O zu einer Suspension bei 92°C für 15min aufgekocht. 5µl der Suspension wurden davon für die Screen-PCR

entnommen (Tabelle 7). Nach Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese analysiert.

**Tabelle 7: Reaktionsbedingungen für eine Screen-PCR von Einzelklonen.**

Ansatz	REDTaq ReadyMix	15 µl
	Forward-Primer	1,2µl
	Reverse-Primer	1,2µl
	Bakterien-Suspension	5µl
	dH <sub>2</sub> O	7,6µl
	Gesamtvolumen	30µl
Bedingungen	95°C 3min	40 Zyklen
	95°C 45sek	
	x°C 1min	
	72°C 2min	
	72°C 5min	
	25°C Pause	

Die Annealingtemperatur (x) ist abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer.

#### 4.1.8 Plasmidpräparation

Bis zu sechs Screen-PCR positive Einzelklone wurden mit einer sterilen Impföse abgetragen und in Selektivmedium über Nacht bei 25°C bei 180rpm im Thermoshake aerob kultiviert. Bei einer optischen Dichte (OD) von 1,0 bis 1,3 im Spektrophotometer wurde die Bakteriensuspension bei 7.000rpm für 10min bei 4°C in der Avanti TMJ-25 Kühlzentrifuge zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes das Pellet bei -20°C eingefroren oder sofort die Plasmid-DNA aus dem Bakterienpellet isoliert und aufgereinigt. Dafür wurden, je nach DNA-Menge, das *Qiaprep Spin Miniprep Kit* bzw. das *QIAGEN Plasmid Midi Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Dadurch wurde die Plasmid-DNA abgetrennt von Zellkomponenten und der chromosomalen bakteriellen DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und anschließender Elution durch Anionenaustauschersäulen.

#### **Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA**

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Spektrophotometer NanoDrop, das auch eine Extinktionsmessung bei den Wellenlängen von 230nm, 260nm und 280nm durchführte. Somit konnte anhand des Quotienten von A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> die Reinheit der



isolierten DNA überprüft werden. Die Absorption bei 260nm wird dabei von den aromatischen Purin- und Pyrimidinringen bestimmt. Eine A<sub>260</sub> von 1,0 entspricht dabei 50µg/ml doppelsträngiger DNA sowie 40µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. RNA. Reine Nukleinsäuren ergeben einen A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> Quotienten von  $\geq 1,8$  ( $\pm 0,2$ ), während Protein-, Phenol- oder andere Verunreinigungen, die eine starke Absorption im Bereich von 280nm aufweisen, den Quotienten erniedrigen. Auch der A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> Quotient kann für die DNA-Reinheit herangezogen werden (1,8-2,2) und zeigt Verunreinigungen mit Stoffen an, deren Absorptionsmaximum bei 230nm liegt, wie z.B. EDTA oder Phenol.

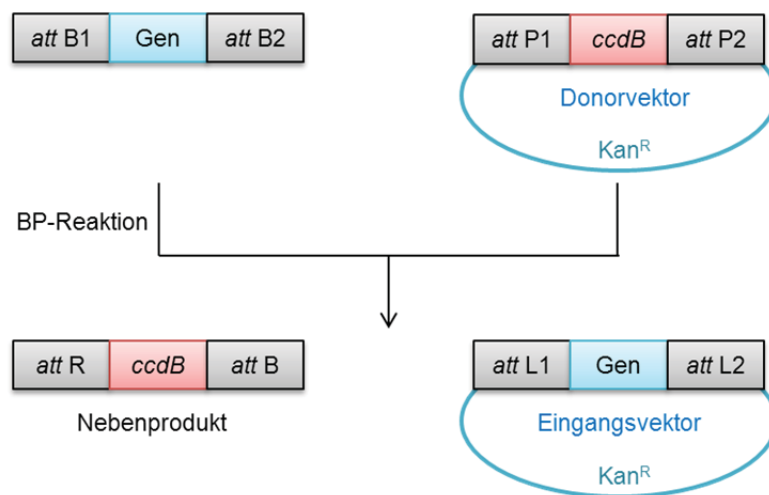
#### **4.1.9 Analytische Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente können aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld zur Analyse von Restriktionsansätzen oder PCRs aufgetrennt werden. Zur analytischen Prüfung wurden Agarosegele verwendet, denen der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid zur anschließenden Detektion der DNA-Banden unter UV-Licht zugegeben wurde. Verwendet wurden je nach Größe der DNA-Fragmente 0,8% bis 1,5%ige Standard-Agarosegele, indem die entsprechende Menge an Agarose mit 1xTBE-Puffer in einer Mikrowelle durch Erhitzen vollständig gelöst und nach Abkühlung mit Ethidiumbromid (10µg/ml) versetzt wurde. Nach Mischung wurde die Gellösung in einem Gelträger in einer Dicke von ca. 0,5cm gegossen, der gewünschte Probentaschenkamm eingesetzt und nach Aushärtung und Ziehen des Kammes das Gel in die Elektrophoresekammer mit 1xTBE-Puffer als Laufpuffer gegeben. Den DNA-Proben wurde vor dem Auftragen in die Geltaschen 1/5 Volumen Ladepuffer (6x *DNA Loading Dye*) zugesetzt, um die DNA in den Geltaschen zu beschweren. Zur Beurteilung der Größe der PCR-Produkte werden diese von einem DNA-Größenstandard flankiert. Die Auftrennung erfolgte unter einer konstanten Spannung von 80 bis 120V. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente wurden diese durch UV-Detektion sichtbar gemacht, fotografiert und mit dem DNA-Größenstandard ausgewertet.

#### **4.1.10 Gateway Technologie**

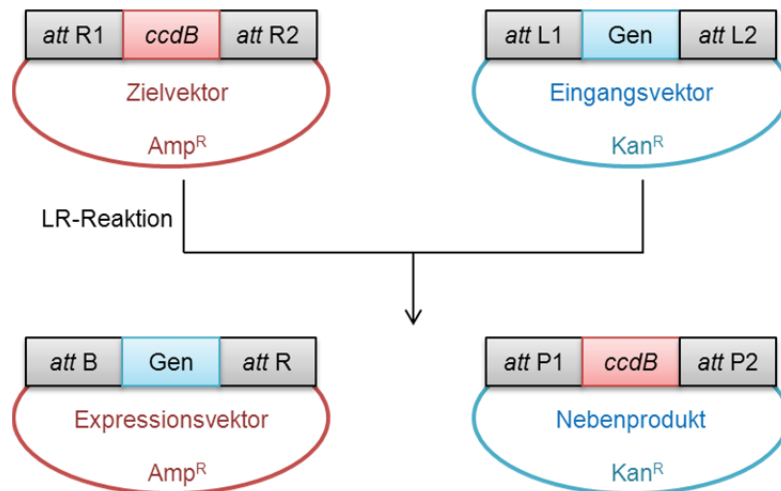
Ein schnelles und gerichtetes Einklonieren von Genen und Genfragmenten wird durch die Gateway Technik (Fa. Invitrogen) ermöglicht und wurde in dieser Arbeit für die Generierung des ROSA26-Targetingvektors sowie der Vektoren zur transienten

bzw. stabilen Transfektion in die MIA PaCa2-Zelllinie verwendet. Dabei nutzt man das sequenzspezifische Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$ , der seine DNA in das Genom von *Escherichia coli* auf diese Weise für den lysogenen oder lytischen Zyklus integriert. Die Rekombination findet an spezifischen Sequenzen, den *attachment-sites* (*att-sites*), statt, wobei die *attB*-Sequenzen Teil des Genoms von *E. coli* sind und die *attP*-sites von  $\lambda$ -Phagen stammen. Als erster Schritt wird die BP-Klonase Reaktion durchgeführt (Abbildung 11). Dazu flankieren die *attB*-Sequenzen aus *E. coli* ein gewünschtes PCR-Amplifikat. Dieses rekombiniert mit einem Donorvektor mit *attP*-Stellen aus den  $\lambda$ -Phagen. Damit das Gen von Interesse auch nach Integration in den Donorvektor die richtige Orientierung erhält, sind die Rekombinationsstellen unterschiedlich konstruiert, so dass *attP1* spezifisch *attB1* und *attP2* spezifisch *attB2* rekombiniert. Nach Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen kommt es auf kanamycinhaltiger Agarplatte zur positiven Selektion aufgrund der im Donorvektor enthaltenen Kanamycinresistenz. Die negative Selektion erfolgt mit dem *ccdB*-Gen, das als Selbstmordgen durch Hemmung der Gyrase fungiert. Dieses wird, flankiert von den *attP*-Sequenzen, bei Rekombination gegen das PCR-Produkt ausgetauscht. Sollte keine Rekombination zustande kommen, verbleibt es im Vektor und führt nach Transformation zum Absterben der Bakterien. Aufgrund dieser doppelten Selektion kann die Effektivität erhöht werden.



**Abbildung 11: BP-Klonasereaktion.** Das Gen von Interesse wird durch die spezifische Rekombination der *attB*-sites mit den *attP*-sites des Donorvektors im Eingangsvektor von *attL*-sites flankiert. Zur Selektion bedient man sich der Kanamycinresistenz ( $\text{Kan}^R$ ) sowie des Selbstmordgens *ccdB*.

Der entstandene Eingangsvektor (*entry vector*) enthält nun die *attL*-Sequenzen aus der spezifischen Rekombinationsreaktion von *attB* und *attP*. Als letzter Schritt erfolgt die LR-Reaktion aus dem Eingangsvektor und dem Zielvektor (*destination vector*), der die für die Rekombination spezifischen *attR*-Stellen, sowie eine Ampicillinresistenz und das *ccdB*-Gen enthält (Abbildung 12). Durch deren Rekombination entsteht der eigentliche Expressionsvektor, der wiederum eine Doppelselektion durch das *ccdB*-Gen und durch die Ampicillinresistenz erfährt.



**Abbildung 12: LR-Klonasereaktion.** Das Gen von Interesse des Eingangsvektors wird durch die spezifische Rekombination der *attL*-sites mit den *attR*-sites des Zielvektors in das Expressionsplasmid kloniert. Zur Selektion bedient man sich eines Resistenzwechsels von der Kanamycin- ( $\text{Kan}^R$ ) zur Ampicillinresistenz ( $\text{Amp}^R$ ) sowie des Selbstmordgens *ccdB*.

Da die Plasmide in dieser Arbeit bereits in Form des Eingangsvektors vorlagen, musste nur noch die LR-Reaktion in den Zielvektor erfolgen.

### **Durchführung der Klonase-Reaktion**

Der Eingangsvektor, wie auch der Zielvektor wurden mit TE-Puffer zuerst auf die gewünschte Konzentration von 37,5ng/ $\mu\text{l}$  eingestellt. Je 1 $\mu\text{l}$  des Eingangsvektors- und Zielvektors wurden mit 0,5 $\mu\text{l}$  des *Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix* gemischt und über Nacht bei 25°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 $\mu\text{l}$  Proteinase K und Inkubation bei 37°C für 10min gestoppt. 2,75 $\mu\text{l}$  des Ansatzes wurden zur Transformation in *Stbl3* Bakterien eingesetzt und mit Restriktions- und Sequenzanalyse überprüft.

## **4.2 In vitro Testung der beiden klonierten Konstrukte**

Für die in vitro Überprüfung der Funktionalität und Wirksamkeit beider klonierter Konstrukte waren verschiedene Ansätze und erneute Umklonierungsmaßnahmen notwendig.

### **4.2.1 Zellkultur**

#### ***MIA PaCa-2 Zelllinie***

Für die in vitro Versuche wurde die MIA PaCa-2 Zelllinie verwendet. Dabei handelt es sich um humane Pankreaskarzinomzellen, die aus einem undifferenzierten, duktalem Adenokarzinom eines 65 Jahre alten kaukasischen Patienten isoliert wurden (Yunis et al., 1977). Die Zellen wachsen adhärent und wurden in Zellkulturflaschen bzw. –schalen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Partialdruck in einem wasserdampfgesättigten Inkubator kultiviert. Zur Passagierung wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Dann wurden die Zellen mit Trypsin für 5 bis 10min bei 37°C inkubiert und somit abgelöst. Diese wurden in Kulturmedium sorgfältig resuspendiert und nach Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer in gewünschter Zellzahl auf neue Zellkulturflaschen oder –schalen aufgeteilt. Die Passagierung erfolgte im Durchschnitt alle 3 bis 4 Tage abhängig von der Zelldichte bei einer Verdopplungszeit der Zellen von 40 Stunden.

#### ***Kryokonservierung der MIA PaCa-2 Zellen***

Nach Abtrypsinierung der Zellen wurde die Zellzahl nach Zentrifugation bei 1.200rpm für 4min auf  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen pro 1ml 1xfach konzentriertem Einfriermedium eingestellt. Jeweils 1ml der Zellsuspension wurde in ein steriles vorgekühltes Kryoröhrchen pipettiert und diese in einem Kryocontainer zunächst für 2 Stunden bei -20°C, danach für 24 Stunden bei -80°C gelagert, bevor sie im Stickstofftank in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Das stufenweise Einfrieren in Anwesenheit von DMSO verhinderte die Eiskristallbildung.

#### ***Auftauen der MIA PaCa-2 Zellen***

Die Zellen wurden in einem auf 37°C vorgewärmten Wasserbad rasch aufgetaut. In eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurden 10ml Auftaumedium vorgelegt und das Zellaliquot hinzugefügt. Danach wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem wasserdampfgesättigten Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit Kultur- oder Selektivmedium.

### **Transfektion**

Transfektion bedeutet das Einbringen von fremder DNA in eukaryotische Zellen durch chemische oder physikalische Methoden. Dabei werden zwei Formen unterschieden, die transiente und die stabile Transfektion. Die Transfektion wurde in dieser Arbeit zur Überprüfung der Funktionalität der klonierten Konstrukte benutzt.

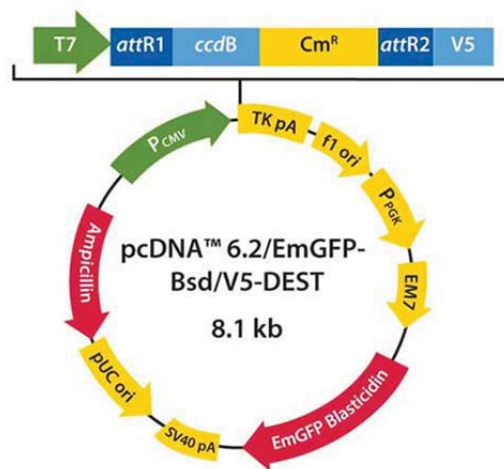
#### *Transiente Transfektion*

Für die transiente Transfektion wird am besten *supercoiled* („überdrehte“) Plasmid-DNA eingesetzt. Die Fremd-DNA wird zwar in den Zellkern transferiert, jedoch nicht chromosomal integriert. Innerhalb weniger Tage (1 bis 4 Tage) wird diese extrachromosomale Plasmid-DNA durch zelluläre Nukleasen abgebaut. Somit handelt es sich bei der transienten Transfektion lediglich um eine temporäre Transgenexpression (Kaufman, 1997). Die Zeitspanne der Expression ist ebenfalls abhängig vom Zelltyp, der Verdopplungszeit und der spezifischen Charakteristik der transferierten Gene (Colosimo et al., 2000). Ein Vorteil der transienten Transfektion ist der geringe Zeit- und Arbeitsaufwand und damit die schnelle Überprüfung auf Expression. Jedoch gibt es große Unterschiede in der Aufnahmeeffizienz und der Expressionsstärke, so dass eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen erschwert wird.

#### *Transiente Transfektion zur Überprüfung des Reportergens LacZ*

In dieser Arbeit sollte vor der Generierung einer stabilen Zelllinie das Expressionsplasmid auf seine Funktion durch die Analyse des Reportergens LacZ mit einer  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) Färbung von transient transfizierten MIA PaCa-2 Zellen überprüft werden. Um die Expression von LacZ zu ermöglichen, wurde die STOP-Kassette oder STOP-*Txnrd2*-IRES aus pEntr-roxSTOProx-*Txnrd2*-IRESLacZ durch enzymatischen Verdau entfernt. Anschließend wurden die neuen Konstrukte nach Religation in einen pcDNA6.2/EmGFP-Bsd/V5-DEST-Vektor (nachfolgend als pcDNA6.2 abgekürzt, Abbildung 13) einkloniert. Die MIA PaCa-2 Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml auf einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die transiente Transfektion bei einer Konfluenz der Zellen von 40-60% mit dem nicht-liposomalen Transfektionsmedium *Effectene* nach Herstellerangaben. Dabei wurden jeweils 3 Verdünnungsstufen (3:1, 3:2 und 6:1) an DNA Konzentration sowohl für die Vektoren pcDNA6.2-rox-*Txnrd2*-IRESLacZ und pcDNA6.2-rox-LacZ, wie auch für die Negativkontrolle und die Positivkontrolle verwendet. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit dem *In Situ*  $\beta$ -Galactosidase

*Staining Kit*  $\beta$ -gal gefärbt. Die Dokumentation erfolgte mit dem Stemi SV11 Mikroskop der Fa. Zeiss.



**Abbildung 13: Expressionvektor pcDNA™ 6.2/EmGFP-Bsd/V5-DEST** (Fa. Invitrogen, <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V36620?CID==%3D%3D%3Dsearch-v36620;20.06.2012>). Der CMV-Promotor ( $P_{CMV}$ ) ermöglicht ein hohes Expressionsniveau in der Zellkultur und ein schnelles und gerichtetes Einklonieren wird durch vorhandene *attR*-sites ermöglicht.

### Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird die Plasmid-DNA spontan in das Genom integriert und stabil bei der Teilung an Tochterzellen weitergegeben. Für die Rekombination ist lineare DNA am besten geeignet, da diese trotz geringerer Aufnahme mit höherer Effizienz ins Genom integriert wird. Jedoch geschieht dies nur in einer Größenordnung von maximal  $10^{-4}$  (Transfektionseffizienz unter 0,01%) (Mühlhardt, 2009), so dass Zellen mit integrierter DNA selektioniert werden müssen. In dieser Arbeit wurde die Selektion mittels eines Resistenzgens in der Plasmid-DNA durchgeführt, so dass nur Zellen mit integriertem Transgen und Expression des Resistenzgens unter dem Druck eines Selektionsmediums mit zugesetztem Antibiotikum überleben konnten. Zwar stellt die stabile Transfektion ein langwieriges Verfahren (Dauer ca. 2 Monate) dar (Mühlhardt, 2009), kann jedoch für die Proteinproduktion oder auch für die Generierung transgener Tiere genutzt werden. Zu beachten ist dabei allerdings, dass die Zelllinien sich zum Teil erheblich in ihrer Expression unterscheiden können, da die Plasmid-DNA zufällig ins Genom integriert und damit die chromosomale Umgebung einen starken Einfluss auf die Expression hat (sog. Positionseffekt).

### *Stabile Transfektion zur Überprüfung des Reportergens LacZ*

Die MIA PaCa-2 Zellen wurden wie für die transiente Transfektion ausgesät und mit einem linearisierten Plasmid mit dem Transfektionsmedium *Effectene* nach Herstellerangaben transfiziert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen jedes Transfektionsansatzes in drei Verdünnungen gesplittet (1:20, 1:40, 1:80). Dafür wurden die Zellen abtrypsiniert und in 1ml Medium resuspendiert. In je ein Loch einer 6-well Platte, in dem zuvor 2ml Medium vorgelegt wurden, wurden für die 1:20 Verdünnung 100µl, für die 1:40 Verdünnung 50µl und für die 1:80 Verdünnung 25µl der Resuspension gegeben. Für diese Schritte wurde jeweils Kulturmedium verwendet. Am nächsten Tag wurde durch Zugabe eines Selektivmediums mit der Selektion begonnen. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Wechsel des Selektivmediums, wobei auch tote Zellen entfernt wurden. Als Einzelkolonien zu erkennen waren, wurden diese unter dem inversen Mikroskop Leica DM IL gepickt und isoliert auf multi-well Platten in Anwesenheit des Selektivmediums mit zweitägigen Wechsel desselbigen kultiviert. Bei ausreichender Zellmenge auf einer 10cm Schale wurde ein Teil in dem Einfriermedium zur Reserve (*backup*) weggefroren. Die Zellklone wurden auf stabile Integration mittels  $\beta$ -gal Färbung (*In Situ  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit*) geprüft und mit dem Axiovert 25 Mikroskop dokumentiert.

### *Ermittlung der Transfektionseffizienz*

Die Transfektionseffizienz ermittelt sich aus der Anzahl  $\beta$ -gal gefärbter Zellen an der Gesamtpopulation in Prozent (Formel 1).

<b>Formel 1: Formel für die Berechnung der Transfektionseffizienz.</b>
Transfektionseffizienz (%) = $\beta$ -gal gefärbte Zellen / Gesamtpopulation x 100

### ***$\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) Färbung***

Das in dieser Arbeit verwendete Reportergen LacZ von *Escherichia coli* (*E. coli*) codiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, welches natürlicherweise die Hydrolyse des Disaccharids Laktose in Glukose und Galaktose katalysiert. In transfizierten Zellen spaltet die  $\beta$ -Galaktosidase das synthetische Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-indoyl- $\beta$ -D-galaktosid) zu Galaktose und 5-Brom-4-chlorindoxyl. Das enzymatisch abgespaltene 5-Brom-4-chlorindoxyl wird durch den Sauerstoff in der Luft zum unlöslichen blauen Farbstoff 5-dibrom-4-dichlor-indigo oxidiert. Für den Einsatz als



Reportergen existieren zwei unterschiedliche LacZ Formen. Die ursprüngliche zytoplasmatische  $\beta$ -Galaktosidase (cLacZ), die zu einer Blaufärbung des Zytoplasmas führt, und die nukleäre  $\beta$ -Galaktosidase (*nuclear leader sequence LacZ*, nlsLacZ). Bei dieser wurde an das LacZ-Gen eine kurze Signalsequenz des Simian Virus 40 (SV 40) fusioniert (Kalderon et al., 1984), die den Transport eines fusionierten Genprodukts vom Zytoplasma einer Zelle in den Zellkern bewirkt. Somit führt nlsLacZ zu einer Blaufärbung des Zellkerns (Bonnerot et al., 1987). Der Nachweis der Expression des Reportergens LacZ erfolgte durch  $\beta$ -gal Färbung der transfizierten Zellen mit dem *In Situ  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit* nach Herstellerangaben. Dabei wurden die Zellen mit einer Glutaraldehyd-Formaldehyd Lösung für 10min bei RT fixiert und dann mit einer Färbelösung, die X-Gal enthält, über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### Überprüfung der Wirksamkeit der STOP-Kassetten

Zur Entfernung der STOP-Kassette wurde das Plasmid pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 mit einer Cre-Rekombinase in vitro inkubiert, wobei je 1unit und 5unit Cre-Rekombinase getestet wurden (Tabelle 8). Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 30min inkubiert mit anschließender Inaktivierung bei 70°C für 10min.

Tabelle 8: Cre-Rekombinase Reaktionsansatz.		
1unit Cre-Rekombinase		5unit Cre-Rekombinase
7 $\mu$ l	pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2	7 $\mu$ l
1 $\mu$ l	Cre Rekominase	5 $\mu$ l
5 $\mu$ l	Cre Puffer	5 $\mu$ l
37 $\mu$ l	dH <sub>2</sub> O	33 $\mu$ l
50 $\mu$ l	Gesamt	50 $\mu$ l

Für den PCR-Nachweis der entfernten STOP-Kassette wurden die Primer CAGGs-sc-UP4 und Dre-sc-LP3 verwendet (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Reaktionsbedingungen zum Nachweis der Entfernung der STOP-Kassette.**

Ansatz	REDTaq ReadyMix	25 $\mu$ l
	CAGGs-sc-UP4	1,2 $\mu$ l
	Dre-sc-LP3	1,2 $\mu$ l
	Reaktionsansatz	7 $\mu$ l bzw. 1 $\mu$ l
	dH <sub>2</sub> O	15,6 $\mu$ l bzw. 21,6 $\mu$ l
	Gesamtvolumen	50 $\mu$ l



---

Bedingungen	95°C	3min	} 40 Zyklen
	95°C	45sek	
	60°C	1min	
	72°C	2min	
	72°C	5min	
	25°C	Pause	

---

## 4.2.2 Western Blotting

### ***Proteingewinnung aus Zellen***

Ausgangsmaterial für den Western Blot waren Zellen auf 10cm Schalen, die zu 80% konfluent waren. Die Proteinisolation erfolgte auf Eis. Die Phosphatase- und Protease-Inhibitoren wurden dem IP-Puffer im Vorfeld im Verhältnis 1:100 zugegeben. Das Kulturmedium wurde von der 10cm Schale abgesaugt und diese 2x gründlich mit PBS gewaschen. Dann wurden 200µl des mit Inhibitoren versetzten IP-Puffers auf die Schale gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und die Zellsuspension in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Nach 30min bei -80°C wurde die Zellsuspension bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 4°C für 20min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in vorgekühlten Kryoröhrchen bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### ***Proteinassay nach Bradford***

Zur weiteren Verwendung der Zelllysate musste die Proteinmenge bestimmt werden, da für eine anschließende Western Blot Analyse alle Proben eine konstante Proteinmenge enthalten müssen. Dies geschah mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976), bei der nach Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue* an die Proteine ein Farbumschlag von rot zu blau entsteht. Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465nm (kationische Form) zu 595nm (anionische Form). Die Zunahme der Absorption bei 595nm kann photometrisch gemessen werden und dadurch die Konzentration einer unbekannten Proteinlösung mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt werden. Als Standard diente eine Eichkurve mit BSA in einer aufsteigenden Konzentration (0,0-10mg/ml). Dazu wurde eine BSA-Stammlösung hergestellt durch das Lösen von 100mg BSA in 1ml IP-Puffer. Die BSA-Verdünnungsreihe wurde durch Verdünnung der BSA-Stammlösung mit IP-Puffer durchgeführt. Die Bradford-Reagenzlösung wurde 1:1 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Die

Messung bei 595nm erfolgte nach Mischen von 1ml der verdünnten Farbstofflösung mit 3µl der erstellten BSA-Verdünnungsreihe in Einmalküvetten nach einer Inkubation von 5min bei RT. Die Messungen erfolgten in Triplets, um größere Abweichungen der Einzelmessungen zu erkennen und den Pipettiervorgang wie auch die spektrophotometrische Messung bei Bedarf zu wiederholen. Anhand der Standardkurve konnte die Proteinkonzentration der unbekannten Proben ermittelt werden. Auch bei diesen wurde Bradford-Reagenzlösung 1:1 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und dann in 1ml der Farbstofflösung 3µl der Proteinprobe unbekannter Konzentration bzw. des Nullwerts (3µl des IP-Puffers) zugegeben und durchmischt. Die Messung erfolgte wiederum dreimal pro Probe nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei RT.

### ***Western Blotting***

Western Blotting ist ein Verfahren, bei dem elektrophoretisch Proteine in einem Acrylamidgel aufgetrennt und diese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (geblottet) werden. Die Detektion erfolgt mittels Antikörpermarkierung, bei der ein für das zu untersuchende Protein spezifischer monoklonaler Antikörper an dessen Antigen bindet und dieser Komplex durch die Bindung eines zweiten enzymkonjugierten polyklonalen Antikörpers gebunden wird. Dies kann autoradiographisch nach Chemilumineszenzreaktion durch Auflegen eines Röntgenfilms dargestellt werden.

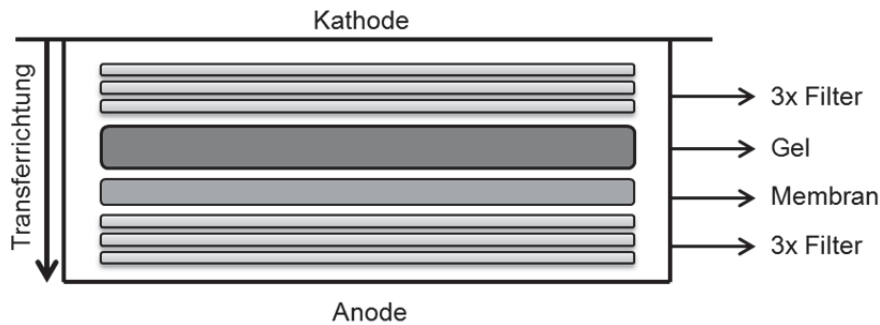
### ***Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)***

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Dazu wurde ein 10%iges Polyacrylamid-Trenngel sowie ein 5%iges Sammelgel hergestellt. Zwischen zwei in einer Halterung senkrecht stehenden Glasplatten wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit wassergesättigtem Butanol bis zur Auspolymerisierung beschichtet. Vor dem Überschichten mit dem Sammelgel wurde das Butanol abgegossen, das Trenngel mehrmals mit dH<sub>2</sub>O gespült und getrocknet. In das Sammelgel wurde sofort nach dem Gießen ein 1,5mm dicker Kamm für die späteren Taschen gesteckt. Das Sammelgel besitzt einen neutralen pH-Wert, im Gegensatz zum basischen Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung erfolgt. Durch den somit entstandenen pH-Gradienten zwischen Sammel- und Trenngel kommt es zu einer Konzentration der Proteine an der Grenze zum Trenngel. Je 20µg Protein wurden mit 5µl Roti-Load1

Ladepuffer und 2µl DTT (1M Dithiothreitol) versetzt. Mit IP-Puffer wurde der Ansatz anschließend auf ein Gesamtvolumen von 25µl aufgefüllt, bei 95°C für 5min inkubiert und vor dem Beladen kurz abzentrifugiert. Das im Ladepuffer enthaltene anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) überdeckt die Eigenladung der Proteine und durch das Aufkochen der Proben kommt es zur Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen (Denaturierung), so dass die Proteine durch aufgebrochene Sekundär- und Tertiärstrukturen linearisiert vorliegen. Zusätzlich wurden die Disulfidbrücken im Protein durch das im Ladepuffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol, wie auch durch die Zugabe von DTT reduziert. Somit erfolgt die Auftrennung der Proteine nicht nach deren Ladung, sondern rein durch deren Größe (denaturierende, diskontinuierliche Methode), d.h. längere Proteine wandern langsamer im Gel als Kürzere. Zur Beurteilung der Größe der aufgetrennten Proteine wurde als Standard 25µl der *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* verwendet. Die Elektrophoresekammer wurde vor dem Beladen mit 1xElektrophoresepuffer aufgefüllt. Nach dem Entfernen des Kammes wurden die Geltaschen vorsichtig mit 1x Elektrophoresepuffer gespült und die Proben sowie der Standard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20mA/Gel und wurde bei Durchlaufen des im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffs Bromphenolblau nach etwa 60min beendet. Während der Elektrophorese wurde die Apparatur gleichzeitig durch einen kontinuierlichen Wasserfluss in der mittleren Kammer zwischen den Gelplatten gekühlt, um Wärmeentstehung und damit Konvektion zu verhindern.

### **Aufbau des Western Blots**

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte nach dem Elektro-Blotting Verfahren. Die Nitrozellulosemembran (*Optitran BA-S85 Nitrocellulose Membrane*) und 6 Filterpapiere (*Amersham Hybond Blotting Paper*) wurden im Semi-dry Puffer eingeweicht. In einem Sandwichverfahren (Abbildung 14) wurden zuerst drei angefeuchtete Filterpapiere und darauf die ebenfalls angefeuchtete Membran luftblasenfrei übereinandergelegt. Dann folgte das Polyacrylamidgel, von dem im Vorfeld das Sammelgel mit Hilfe eines Skalpells abgetrennt wurde, abgedeckt von drei angefeuchteten Filterpapieren. Nach Einspannen zwischen zwei Flächenelektroden (*PerfectBlue Semi-Dry Electrobloetter*) wurde bei konstantem Strom von ca. 3mA pro cm<sup>2</sup> für ca. 2 Stunden geblottet.



**Abbildung 14: Aufbau des Western Blots.** Die Transferrichtung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte in einem Elektrophoretor von der Kathode zur Anode und damit vom Gel auf die Membran.

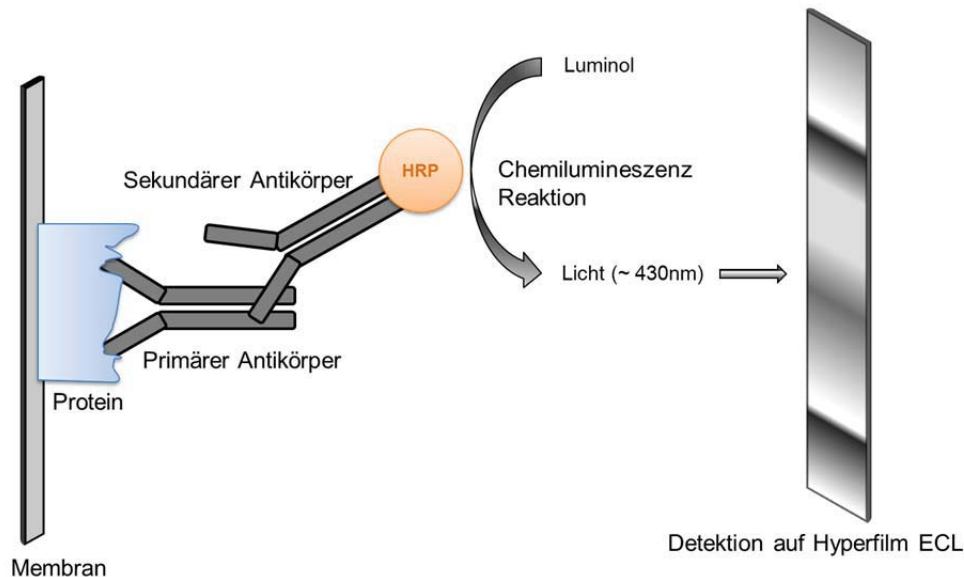
### **Antikörperbindung**

Für die anschließende immunhistochemische Färbung wurde die Membran dreimal für 5min in 1xTBST-Puffer unter Schütteln gewaschen und anschließend die unspezifischen Bindungsstellen mit 5% Milchpulver in 1xTBST-Puffer (MP-TBST) für 1 Stunde bei RT geblockt. Die Inkubation mit primärem Antikörper erfolgte bei 4°C über Nacht (in Verdünnungen von 1:50 bis 1:1.000 in 5%igen MP-TBST). Danach wurde die Membran zweimal für 15min in 1xTBST-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Inkubation des sekundären HRP-gekoppelten Antikörpers für 1 Stunde bei RT in einer Verdünnung von 1:10.000 in 5%igen MP-TBST durchgeführt. Wiederum erfolgte ein zweimaliges Waschen für je 15min in 1xTBST-Puffer zur Entfernung von ungebundenem Antikörper.

### **ECL Detektion**

Die Signaldetektion erfolgte mittels des *Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents*. Bei diesem Verfahren katalysiert die am sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) die Oxidation von Luminol und damit die Entstehung der Chemilumineszenz (430nm). Diese Lumineszenz kann anschließend auf Röntgenfilmen detektiert werden (Abbildung 15). Es wurden beide Reagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt und 0,125ml/cm<sup>2</sup> Membran verwendet. Diese Lösung wurde für 1min auf die Membran gebracht. Danach wurde das Reagenz abgeschüttet, die Membran in einer Folie in eine Filmkassette gelegt und für unterschiedliche Zeitpunkte mit einem Film (*Amersham*

*Hyperfilm™ ECL*) bedeckt. Die optimalen Belichtungszeiten variierten je nach Blot zwischen 30sek und 3min. Die belichteten Filme wurden maschinell entwickelt.



**Abbildung 15: Prinzip der ECL Detektion.** Durch die HRP-katalysierte Oxidation von Luminol entsteht eine Chemilumineszenz, die mittels Röntgenfilm detektiert werden kann.

### **Strippen der Membran**

Unter Strippen versteht man die Entfernung des primären Antikörpers von der Membran. Dadurch hat man die Möglichkeit die Membran für eine Inkubation mit einem weiteren primären Antikörper noch einmal zu verwenden. Dafür wurde die Membran mit 1xTBST-Puffer für 5min gewaschen und dann mit 25ml Stripping-Puffer für 25min bei 55°C gestrippt. Nach zweimaligem Waschen mit 1xTBST-Puffer für je 10min konnte die Membran erneut mit einem primären Antikörper inkubiert werden.

## **4.3 Evaluierung der Screen-PCR zur Überprüfung selektionsresistenter ES-Zellklone**

### **4.3.1 Prüfung der Screen-PCR für die ROSA26 Klone**

Die PCR-Bedingungen für den Screen der ROSA26 ES-Zellen wurde mit der Zelllinie P141PPT2 ermittelt, da auch in dieser Zelllinie der ROSA26-Genlocus genetisch manipuliert wurde. Durch eine Gradienten-PCR mit der *HotStarTaq DNA Polymerase* musste dabei sowohl der optimale Temperaturbereich, als auch die richtige Primerkombination gewählt werden. Als Primer fanden ROS-ES-LP1 in Kombination mit ROS-ES-UP1, ROS-ES-UP2 oder ROSA-26-Prom-UP3 Verwendung, wie auch

Soriano-SA-LP ebenfalls mit ROS-ES-UP1, ROS-ES-UP2 oder ROSA-26-Prom-UP3. Der Gradient der Annealingtemperatur umfasste den Bereich von 55°C bis 70,9°C.

#### 4.3.2 Etablierung der Screen-PCR für die Hprt Klone

Für die Screen-PCR des Hprt-Lokus wurden 4 Primerpaare entworfen und die Primer-Kombinationen Hprt-ES-sc-UP1 und CAG-sc-LP1, Hprt-ES-sc-UP1 und CAG-sc-LP2, Hprt-ES-sc-UP1 und CAG-sc-LP3 sowie Hprt-ES-sc-UP2 und CAG-sc-LP4 mit der *Finnzymes Phire Hot Start II DNA Polymerase* in einer Gradienten-PCR (55°C bis 68,3°C) getestet.

### 4.4 ES-Zellkultur

#### 4.4.1 Kultur von embryonalen Stammzellen (IDG3.2)

Bei der ES-Zelllinie IDG3.2 handelt es sich um eine männliche F1-Hybrid Zelllinie der beiden Inzuchtstämme C57BL/6J und 129S6/SvEvTac (Abbildung 16) (GGTC; 2012).

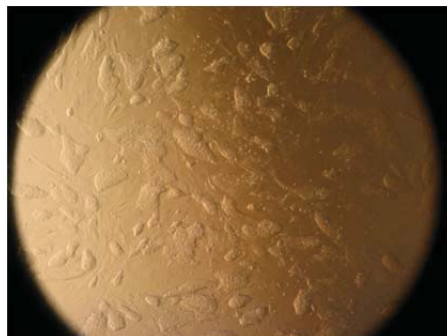


Abbildung 16: IDG3.2 ES-Zelllinie ((C57BL/6J x 129S6/SvEvTac) F1).

Diese wurde auf feederhaltigen Platten in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Partialdruck in einem wasserdampfgesättigten Inkubator kultiviert. Die Feederzellen sind murine embryonale Fibroblasten (MEFs), die gegen G418 resistent sind und mit Mitomycin C (MMC) behandelt wurden. MMC ist ein zytotoxisches Antibiotikum, das in der Tumorthherapie eingesetzt wird und die Zellteilung der Feederzellen inhibiert (Ponchio et al., 2000). Es hemmt die DNA-Synthese durch Einlagerung und kovalente Bindung der DNA-Stränge aneinander, so dass eine Dissoziation des Doppelstranges nicht mehr möglich ist. Adhärente Feederzellen werden eingesetzt, um eine Differenzierung der auf ihnen ausplattierten ES-Zellen zu verhindern. Feederhaltige Platten wurden als Serviceleistung des Instituts für Entwicklungs-genetik (Helmholtz Zentrum München) zur Verfügung gestellt.

*Auftauen und Expansion von ES-Zellen:*

Kryokonservierte ES-Zellen wurden im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und dann mit 10ml Kulturmedium für 4min bei 1.200rpm abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde anschließend in 5ml Medium resuspendiert und auf eine 6cm feederhaltige Platte gleichmäßig ausplattiert. Jeden Tag wurde das Kulturmedium gewechselt und alle 2-3 Tage die Zellen passagiert, indem sie mit PBS gewaschen und nachfolgend mit Trypsin/EDTA für 5-10min bei 37°C abgelöst wurden. Die Trypsin-Reaktion wurde dann mit FCS-haltigem Kulturmedium abgestoppt, die ES-Zellen durch vorsichtiges mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und die im Medium aufgenommenen Zellen in der Regel 1:4 verdünnt auf frische Feederplatten ausgesät.

*Kryokonservierung von ES-Zellen:*

Nach Waschen mit PBS und Trypsininierung wurden die ES-Zellen in Einfriermedium resuspendiert. Jeweils 1ml der Zellsuspension wurde in ein steriles vorgekühltes Kryoröhrchen pipettiert und dieses in einem Kryocontainer bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dann in einen Tank mit flüssigem Stickstoff umgelagert.

**4.4.2 Linearisierung der Targeting-DNA**

Vor der Elektroporation in die murinen embryonalen Stammzellen musste die Targeting-DNA vorbereitet werden. Um die Aufnahme und homologe Rekombination der Targeting-DNA zu erhöhen, wurden die Targetingvektoren linearisiert. Dazu wurde ausschließlich mit dem *EndoFree Plasmid Maxi* Kit nach Herstellerangaben gereinigte Plasmid-DNA verwendet, um die Transfektionseffizienz durch bakterielle Endotoxine nicht zu beeinträchtigen. Ein Teil der Plasmid-DNA wurde im Vorfeld durch einen Restriktionsverdau mit einem funktionstüchtigen einmal-schneidenden Enzym auf Vollständigkeit geprüft. Danach wurden 30µg der DNA in einem Gesamtvolumen von 60µl in einem Restriktionsverdau für 2 Stunden bei 37°C linearisiert und für 20min bei 65°C das Enzym inaktiviert. Die Linearisierung wurde gelelektrophoretisch mit der *1Kb DNA Extension Ladder* beurteilt.

**4.4.3 Elektroporation**

Zur Transfektion der Targetingvektoren in Säugetierzellen wurde eine Elektroporation durchgeführt. Diese Methode ermöglicht das Einschleusen von DNA in eukaryotische Zellen in einem elektrischen Feld durch Permeabilisierung der Zellmembran. Für die



Elektroporation wurden eingefrorene ES-Zellen auf einer 6cm feederhaltigen Platte aufgetaut und kultiviert. Nach zwei Tagen wurden sie 1:4 auf 4x10cm Platten gegeben und innerhalb von zwei Tagen expandiert. 24 bis 36 Stunden nach der letzten Passage wurde die Transfektion bei einer Konfluenz von 50-70% mittels Elektroporation durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 3ml Trypsin für 10min bei 37°C abgelöst, mit 3ml Medium resuspendiert und für 4min bei 1.200rpm abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1ml PBS resuspendiert und zur Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer ein Aliquot 1:10 mit PBS verdünnt. Pro Elektroporation wurden  $7 \times 10^6$  ES-Zellen und 20µg linearisierte Targeting-DNA in einer Elektroporationsküvette mit vorgekühltem PBS auf ein Endvolumen von maximal 900µl gemischt und auf Eis gekühlt. Die Elektroporation erfolgte bei 500µF und 240V im *Gene Pulser*. Nach 10min bei RT wurden die elektroporierten, wie auch die als Kontrolle verwendeten unbehandelten ES-Zellen in 2ml Kulturmedium aufgenommen und auf jeweils zwei 10cm Feederplatten, die bereits 9ml Medium enthielten, ausplattiert und in den Brutschrank gegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

#### **4.4.4 Selektion positiver ES-Zellklone**

Einen Tag nach der Elektroporation wurde mit der Selektion der elektroporierten Zellen wie auch der Kontrollzellen, unelektroporierte WT-ES-Zellen, mit Geneticin (*G418 Sulfate* (140µg/ml)) versetztem Kulturmedium begonnen. Geneticin (G418) ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das irreversibel an die 80S Ribosomenuntereinheit der Zellen bindet und dadurch eine Hemmung der Elongation der Translation und somit der Proteinsynthese bewirkt. Die G418 Selektion wird ermöglicht durch das Neomycinresistenzgen (Neomycin-Phosphotransferase II (*nptII*) Gen) auf dem Plasmidvektor, das auch kurz als neo bezeichnet wird und für das Enzym Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase (*aph(3')*-II oder *NPTII*) codiert. Dieses phosphoryliert G418 und unterbindet somit dessen zytotoxische Wirkung. Auf diese Weise überleben nur Zellen mit integriertem Transgen, das eine PGK-neo-Kassette enthält. Für die Gewährleistung eines hohen Expressionsniveaus ist 5' von neo ein Phosphoglycerokinase (PGK)-Promotor vorhanden. Das Selektivmedium wurde täglich gewechselt und nach Isolation von Einzelkolonien wurde wieder Kulturmedium ohne Zusatz von G418 verwendet.



***Isolation und Expansion selektionierter ES-Zellklone***

Die Einzelklone wurden in PBS mit einer sterilen Pipettenspitze abgelöst und in einer 96well Platte für 10min bei 37°C durch Trypsinierung vereinzelt. Bei den Kolonien wurde auf eine klar abgegrenzte Oberfläche als ein Indiz für einen undifferenzierten Zustand geachtet. Die vereinzelter Klone wurden auf 96-Loch Platten mit Feederzellen und Kulturmedium ausplattiert und nach 2-3 Tagen 1:3 auf 96-Loch Platten als Triplikate gesplittet. Zwei 96well Platten wurden dabei zur späteren Kryokonservierung verwendet, indem die Zellen nach 2-3 Tagen Kultivierung mit PBS gewaschen, mit 30µl Trypsin für 5min bei 37°C abgelöst und mit 170µl kaltem Einfriermedium resuspendiert wurden. Dann wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und anschließend bei -80°C als Rückstellprobe eingefroren. Die verbliebene 96-Loch Platte wurde für die weitere Expansion der ES-Zellklone verwendet. Während der Expansion wurden die Zellklone als Duplikate auf zwei 6cm Platten aufgeteilt, von denen eine nach Expansion zur 10cm Platte der anschließenden Kryokonservierung und die andere der DNA-Präparation und Analyse mittels PCR und Southern Blot diente.

***Lyse von ES-Zellen für die Screen-PCR***

Es wurden sowohl die nach Selektion potentiell positiven Zellklone, als auch unbehandelte WT-Zellen als Negativkontrolle für die Screen-PCR lysiert. Nach Absaugen des Mediums wurde pro 6cm Schale konfluent gewachsener Zellen 4ml DNA-Lysispuffer, dem vor Gebrauch Proteinase K zugefügt wurde, gegeben und die Zellen bei 55°C über Nacht lysiert. Am nächsten Tag wurden 8ml 100% Ethanol pro 6cm Schale zugefügt und bei RT über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die 6cm Schalen vorsichtig abgekippt und die DNA mit 2ml 70%igen Ethanol dreimal für mindestens 15min gewaschen. Die Platten wurden nach dem letzten Waschschrift für 10min getrocknet und danach die DNA in 2ml dH<sub>2</sub>O mit einem Zellschaber abgelöst und in 2ml Eppendorfgefäße übergeführt. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei 4°C.

## 4.5 Screen-PCR der potentiell positiven Zellklone

### 4.5.1 ROSA26 ES Screen-PCR

Die ROSA26-Zellklone wurden durch eine Screen-PCR (Tabelle 10) geprüft.

**Tabelle 10: Reaktionsbedingungen für die ROSA26 ES Screen-PCR.**

Ansatz	ROS-ES-LP1	1,0µl
	ROS-ES-UP1	1,0µl
	5xQ-Solution	5,5µl
	10xPuffer	2,5µl
	2xdNTPs	5,0µl
	DNA	1,0µl
	HotStarTaq	0,18µl
	dH <sub>2</sub> O	8,8µl
	Gesamtvolumen	25µl

Bedingungen	95°C	16min	} 40 Zyklen; Δdt3
	95°C	40sek	
	62°C	40sek	
	65°C	4min	
	65°C	10min	
	25°C	Pause	

### 4.5.2 Überprüfung der Screen-PCR positiven ROSA26-Klone mit PCR und TaqMan

Überprüfung der ROSA26-Zellklone durch PCRs (Tabelle 11) und TaqMan-Technologie.

**Tabelle 11: Reaktionsbedingungen zur Überprüfung der ROSA26-Klone.**

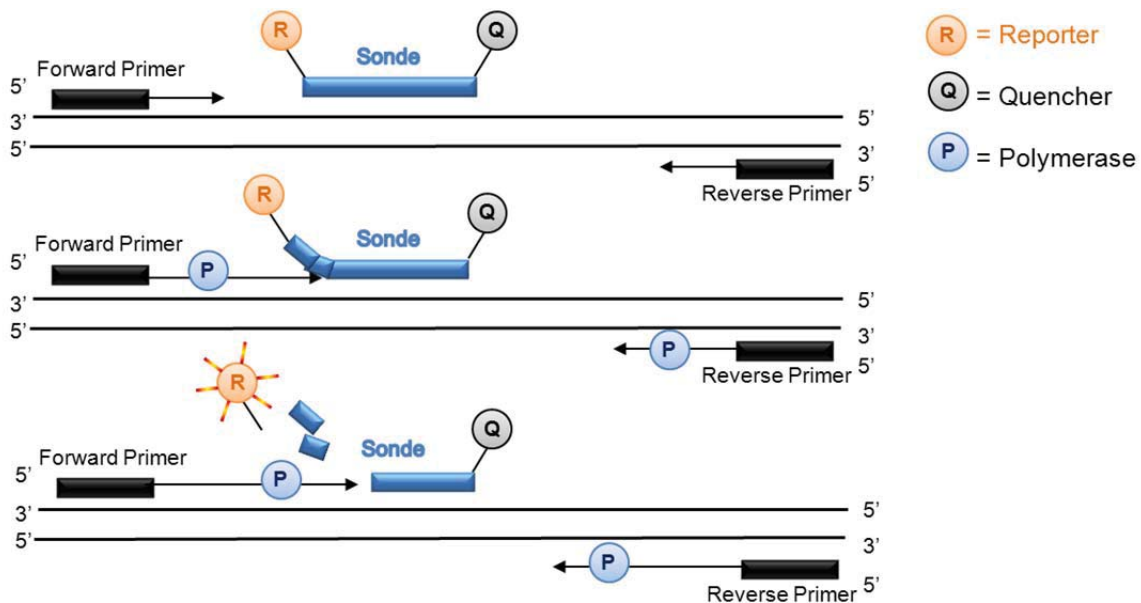
Ansatz für die Überprüfung der pA-site:	BrpA-UP	1,0µl
	BrpA-LP	1,0µl
	5xQ-Solution	5,5µl
	10xPuffer	2,5µl
	2xdNTPs	5,0µl
	DNA	1,0µl
	HotStarTaq	0,18µl
	dH <sub>2</sub> O	8,8µl
	Gesamtvolumen	25µl

Ansatz für die Überprüfung der STOP- <i>Txnrd2</i> -Kassette:	pGL3-pA-Pause-UP	1,0µl
	TR2E10	1,0µl
	5xQ-Solution	5,5µl
	10xPuffer	2,5µl
	2xdNTPs	5,0µl
	DNA	1,0µl
	HotStarTaq	0,18µl
	dH <sub>2</sub> O	8,8µl
Gesamtvolumen		25µl
Bedingungen	95°C 16min	40 Zyklen; Δdt3
	95°C 40sek	
	62°C 40sek	
	65°C 4min	
	65°C 10min	
	25°C Pause	

### **TaqMan Technologie**

Die TaqMan Technologie basiert auf einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (*quantitative real-time polymerase chain reaction*; qPCR), die eine Quantifizierung von PCR-Produkten durch die proportionale Zunahme eines fluoreszierenden Signals ermöglicht. Dabei wird neben den bei herkömmlichen PCRs ebenfalls eingesetzten Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), dem Primerpaar und der Taq-Polymerase auch ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, die sog. Sonde, verwendet. In diesem Fall wurde eine Hydrolysensonde oder TaqMan-Sonde verwendet, die 5'-terminal mit einem Reporterfluorophor (fluoreszenter Reporterfarbstoff) markiert ist und an deren 3'-Ende ein Quencher (Fluoreszenzlöcher) vorhanden ist. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde FAM (6-Carboxyfluorescein) und als Quencher BHQ1 (*Black Hole Quencher*) gewählt. Bei FAM befindet sich die Absorption bei 495nm und die Emission bei 520nm. Die maximale Absorption von BHQ1 liegt bei 534nm und der Bereich der Fluoreszenzlöschung (sog. Quenching Bereich) geht von 480 bis 580nm. Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA hybridisieren zunächst Sonde und Primer an den Matrizenstrang. Von den Primern ausgehend findet die Elongation der Zielsequenz durch die Taq-Polymerase durch Anhängen von Nukleotiden statt. Bei noch intakter Sonde unterdrückt der Quencher die Fluoreszenzemission des

Reporters bedingt durch deren räumliche Nähe zueinander (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET (Cardullo et al., 1988)). Durch die 5'→3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde beginnend am 5'-Ende vom DNA-Strang hydrolytisch abgespalten und es folgt die räumliche Trennung von Reporter und Quencher. Dadurch wird der FRET des Quenchers aufgehoben und das Fluoreszenzsignal des Reporters kann gemessen werden. Dabei ist die Zunahme der Fluoreszenz proportional zur Amplifikatmenge (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Schematische Darstellung des TaqMan Verfahrens.** Im ersten Schritt des TaqMans hybridisieren Sonde und Primer an den DNA-Matrizenstrang. Anschließend erfolgt von den Primern ausgehend die Elongation der Zielsequenz durch die Taq-Polymerase (P) durch Anhängen von Nukleotiden. Dabei wird die Sonde beginnend am 5'-Ende vom DNA-Strang hydrolytisch abgespalten, wodurch eine räumliche Trennung zwischen Reporter (R) und Quencher (Q) entsteht. Dadurch wird die Unterdrückung des Fluoreszenzsignals durch die räumliche Nähe zum Quencher aufgehoben und die Fluoreszenz des Reporters kann gemessen werden.

Bei der qPCR unterscheidet man die Startphase mit nur geringer Menge an Ziel-DNA und die Plateauphase, in der die PCR durch Hybridisieren der PCR-Produkte miteinander und Verbrauch der Ausgangsmaterialien gehemmt wird. In der dazwischen liegenden exponentiellen Phase verdoppelt sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen bei jedem Zyklus. Für die Quantifizierung wird jeder Zyklus am Anfang der exponentiellen Phase genutzt, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über der Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Dieser Schwellenwert wird als ct-Wert (*ct=cycle threshold*) bezeichnet.

Durch einen Vergleich von ct-Werten kann eine Aussage über die Häufigkeit von Rekombinationsereignissen in den transfizierten ES-Zellen getroffen werden. Dabei wird die Menge inserierter DNA in Relation zu einem einmalig im Genom vorhandenen Referenzgen (z.B.  $\beta$ -Aktin) gesetzt. Bei den ct-Werten des Referenzgens im Proben- und Kontrollgewebe sollte keine Varianz auftreten.

Es wurde eine neo-Standardreihe mit dem Targetingplasmid, das für die Elektroporation verwendet wurde, erstellt. Dieses musste zuerst auf eine Kopienzahl von  $1 \times 10^9$  Kopien pro  $\mu\text{l}$  eingestellt werden. Anhand der Konzentration und der Größe des Plasmids, sowie der Größe des PCR-Produkts konnte die benötigte Kopienzahl berechnet werden. Pro Basenpaar besitzt DNA ein Molekulargewicht von 660g/mol. Anschließend wurde die Zahl der Kopien pro g DNA ermittelt, indem die Avogadro-Konstante durch das Molekulargewicht des Plasmids geteilt wurde. Dieser Wert wurde dann mit der Konzentration der DNA multipliziert, um die Anzahl der Moleküle pro  $\mu\text{l}$  zu erhalten. Die Kopienzahl von  $1 \times 10^9$  Kopien pro  $\mu\text{l}$  wurde mit TE-Puffer eingestellt und entspricht dabei der Verdünnungsstufe S0. Ausgehend von dieser wurde eine Verdünnungsreihe mit TE-Puffer angelegt und die Verdünnungsstufen SI ( $1 \times 10^8$ ), SII ( $1 \times 10^7$ ), SIII ( $5 \times 10^6$ ), SIV ( $5 \times 10^5$ ), SV ( $1 \times 10^5$ ), SVI ( $2 \times 10^4$ ), SVII ( $4 \times 10^3$ ) und SVIII ( $8 \times 10^2$ ) hergestellt. Die Verdünnungsstufen SIII, SIV, SV, SVI, SVII und SVIII wurden für den TaqMan in Triplets eingesetzt. Zur Erstellung der internen Kontrolle wurde eine Standardreihe von einem beliebigen ES-Zellklon verwendet. Dessen Ursprungskonzentration wurde S0 gesetzt und davon ausgehend 1:5 mit TE-Puffer verdünnt und fünf Verdünnungsstufen (S0 bis S5) ebenfalls als Triplets eingesetzt. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 40ng/ $\mu\text{l}$  mit TE-Puffer verdünnt und ebenfalls als Triplets sowohl in der Reaktion für neo, als auch für den Standard eingesetzt. Die qPCR wurde mit dem *TaqMan Universal Master Mix II* in einem Gesamtvolumen von 25 $\mu\text{l}$  durchgeführt (Tabelle 12). Zwei Negativkontrollen, die eine mit Wasser und die andere mit TE-Puffer, wurden für beide Reaktionsansätze mitgeführt.

**Tabelle 12: Reaktionsbedingungen TaqMan.**

Ansatz	Enzymmix	12,50µl
	<i>forward</i> Primer (900 nM)	2,25µl
	<i>reverse</i> Primer (900 nM)	2,25µl
	Sonde (200 nM)	1,25µl
	Probe	5,00µl
	dH <sub>2</sub> O	1,75
	Gesamtvolumen	25,0µl

**Bedingungen:**

	Zyklenzahl	Temperatur	Zeit	
<i>holding stage</i>	<b>1</b>	<b>50°C</b>	<b>2min</b>	Dekontamination/
		<b>95°C</b>	<b>10min</b>	Initiale Denaturierung
<i>cycling stage</i>	<b>40</b>	<b>95°C</b>	<b>15sek</b>	Denaturierung
		<b>60°C</b>	<b>1min</b>	Hybridisierung

**4.5.3 Hprt ES Screen-PCR**

Überprüfung rekombinierter Hprt ES-Zellklone via PCR (Tabelle 13).

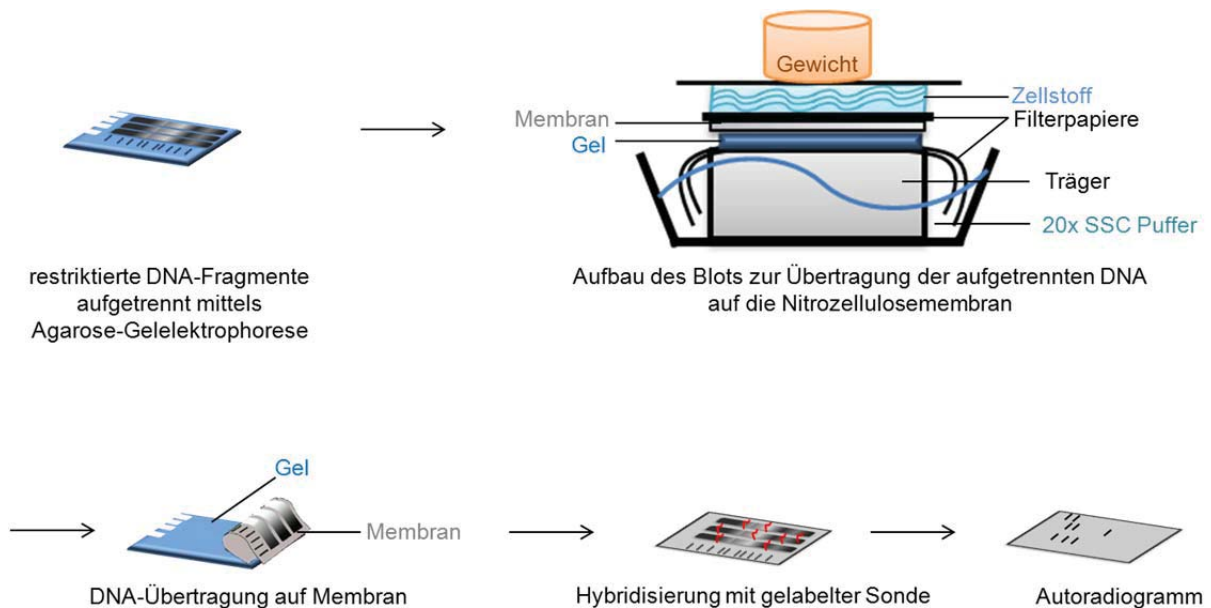
**Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für die Hprt ES Screen-PCR.**

Ansatz	HPRT-ES-sc-UP1	1µl
	CAG-sc-LP3	1µl
	5xPuffer	4µl
	2xdNTPs	2µl
	DMSO	0,6µl
	DNA	1µl
	<i>Phire Hot Start II</i>	0,4µl
	dH <sub>2</sub> O	7µl
	Gesamtvolumen	20µl

Bedingungen	98°C	1min	} 35 Zyklen; Δdt3
	98°C	40sek	
	67°C	45sek	
	72°C	4min	
	72°C	10min	
	25°C	Pause	

#### 4.5.4 Southern Blot Analyse der genomischen DNA der Hprt-Klone

Die in der Screen-PCR positiven Zellklone wurden durch einen Southern Blot geprüft. Bei der von Southern im Jahr 1975 entwickelten Methode werden DNA-Fragmente nach Restriktionsfragmentanalyse mittels enzymatischem Verdaus von einem Agarosegel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und nach Hybridisierung mit spezifischen, radioaktiv markierten Sonden homologe DNA-Fragmente detektiert (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Schematische Darstellung der Southern Blot Analyse.** Die DNA wurde durch Restriktionsverdaus geschnitten und die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Übertragung der aufgetrennten DNA auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mittels Kapillarkraft durch den Durchfluss einer Salzlösung über die unten liegenden Filterpapiere, deren Enden in einer Wanne mit SSC-Puffer hängen, über das Gel und die Membran zu den an der Oberfläche befindlichen Filterpapieren und Zellstoff. Die spezifische Bindung radioaktiv markierter Sonde an gewünschte DNA-Fragmente kann über einen Röntgenfilm detektiert werden.

#### Enzymatischer Restriktionsverdaus der genomischen DNA

Die DNA wird durch enzymatischen Verdaus in verschieden große Fragmente geschnitten und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch homologe Rekombination des Targetingvektors, der ebenfalls Restriktionsschnittstellen enthält, folgt eine Verlängerung oder Verkürzung des zugehörigen Fragments. Somit kommt es zu einer Verschiebung der Bande im Gel im Vergleich zur WT-Bande. Dafür wurden 10µg genomischer DNA mit 1µl hochkonzentriertem Enzym, 3µl für das Enzym empfohlenen Puffer, 0,25µl RNase und 1µl Spermidin in einem Gesamtansatz von 30µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt verdaus. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 24

Stunden. Durch den enzymatischen Verdau entstehen unterschiedliche Fragmente (Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)), die im Anschluss gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt wurden.

### ***Analytische Gelelektrophorese der genomischen DNA***

Die DNA-Restriktionsfragmente wurden ihrer Größe nach in einem 0,8%igen analytischen Gel bei 40V für 16 Stunden aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit je 5µl Ladepuffer gemischt. Durch Vergleich mit einem aufgetragenen Standard (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*) konnte die Auftrennung der DNA-Fragmente beurteilt werden.

### ***Kapillarblot der genomischen DNA***

Die Übertragung der DNA-Fragmente auf die Nitrozellulosemembran (*Amersham Hybond-N+*) mittels Kapillarkraft erfolgt durch den Durchfluss einer Salzlösung (SSC-Puffer) von unten über das Gel und die Membran zum an der Oberfläche befindlichen saugfähigen Zellstoff. Dadurch wird die DNA von der Oberfläche des Gels auf die Unterseite der Membran, in deren Maschen sie hängen bleibt, übertragen.

Das Agarosegel wurde zunächst bei RT für mind. 1 Stunde in Denaturierungspuffer geschüttelt, dann zweimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich in Neutralisationspuffer für 1 Stunde inkubiert. Nach Spülen mit 2x SSC wurde der Blot aufgebaut. Da das Blotten über Nacht erfolgte, wurden die beiden unten liegenden Filterpapiere (*3MM-CHR*) auf einem Träger über eine Wanne mit 20x SSC-Puffer gelegt und deren Enden in den Puffer gehängt. So konnte ein Austrocknen der Filterpapiere verhindert werden. Die Filterpapiere wurden vor dem Auslegen mit 20x SSC getränkt und mit einer Pipette vorhandene Luftblasen ausgestrichen. Dann wurde das Agarosegel auf die Filterpapiere gelagert und ebenfalls glatt gestrichen. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran sowie 2 Filterpapiere, jeweils eingeweicht in 2x SSC, auf dem Gel luftblasenfrei aufgelegt. Den Abschluss bildeten saugfähiger Zellstoff und eine Glasplatte, die mit Gewichten beschwert wurde, um einen effizienten kapillaren Transfer zu gewährleisten. Nach Abbau des Blots wurden die Geldaschen auf der Membran markiert und diese anschließend in 2x SSC gewaschen. Als letzter Schritt fand das sogenannte *crosslinken* (Stratalinker® UV Crosslinker) statt, bei dem die DNA dauerhaft auf der Membran durch UV-Bestrahlung fixiert wurde.



***Herstellung und radioaktive Markierung (labeln) von DNA-Sonden***

Die Herstellung der Sonden erfolgte mittels PCR an DNA lysierter WT ES-Zellen. Dazu wurden die in der Publikation von Yusa et al. (Yusa et al., 2011) verwendeten Primerpaare zur Sondengenerierung für den Hprt-Lokus benutzt. Dadurch wurde der gewünschte Matrizenbereich amplifiziert und konnte nach Gelelektion als Gensonde verwendet werden, da sie zur gesuchten Sequenz komplementär war. Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte nach der „*random primed*“ Methode von Feinberg et al. (Feinberg & Vogelstein, 1983). Bis zu 25ng DNA wurden in ein Endvolumen von 45µl TE-Puffer eingesetzt, 5min bei 95°C in einem Heizblock denaturiert und anschließend auf Eis schockgekühlt. Nach Zentrifugation wurde die DNA in das Reaktionstube von *Amersham Rediprime II DNA Labeling System* gegeben und mit 5µl des radioaktiven Nukleotids [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP nach Herstellerangaben markiert. Zur Entsalzung, Entpufferung und Entfernung von überschüssigen Nukleotiden wurden die Sonden mit einer Säule von *illustra MicroSpin Columns* nach Herstellerangaben gereinigt. Die inkorporierte Radioaktivität wurde mit einem Szintillationszähler gemessen, wobei die Werte für eine anschließende Hybridisierung bei mind. 100.000cpm liegen sollten und die Sonden vor der Hybridisierung bei 95°C für 5min denaturiert wurden.

***Hybridisierung***

Bei der Hybridisierung werden DNA-Fragmente spezifisch mit radioaktiven Sonden markiert. Die Membran wurde, angefeuchtet mit 2x SSC, eingerollt und mit 50ml Hybridisierungspuffer in einer Hybridisierungsröhre für ca. 1 Stunde in einem Rotationshybridisierungssofen bei 65°C inkubiert (Prähybridisierung). Nach Abgießen des Hybridisierungspuffers wurde die zuvor radioaktiv markierte und denaturierte Sonde mit 10ml neuem Hybridisierungspuffer zugegeben und die Membran bei 65°C über Nacht in dem Hybridisierungssofen hybridisiert. Dabei bildet die Sonde spezifische Basenpaarungen mit der zuvor denaturierten DNA aus und bindet dauerhaft in diesem Bereich (Hybridisierung).

***Waschen der hybridisierten Membran***

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zur Entfernung von ungebundener Sonde dreimal je 10min bei 65°C mit Waschpuffer gewaschen. Bei 80 bis 100cpm, gemessen mit einem Geigerzähler, wurde die Membran in einer Folie in eine Filmkassette eingelegt und mit einem Röntgenfilm (*Kodak BioMax MS Film*) bedeckt.

Die Kassette wurde bis zu 2 Wochen bei -80°C bis zur Entwicklung des belichteten Films gelagert und anschließend maschinell entwickelt.

#### **4.6 Mykoplasmentest der ROSA26 und Hprt ES-Zellklone**

Die positiv getesteten ES-Zellklone wurden auf Mykoplasmenkontamination mittels PCR untersucht. Mykoplasmen sind zellwandlose, von einer Zytoplasmamembran umgebende Bakterien, die parasitär Zellen befallen. Dadurch wachsen Zellen langsamer und in einer geringeren Dichte. Problematisch ist dabei v.a. die Kontamination bei ES-Zellen, da Mykoplasmen die Chromosomen verändern können und somit die Gefahr besteht, dass sich aus einer kontaminierten ES-Zelllinie keine Chimären entwickeln. Da lichtmikroskopisch nicht erkennbar, wurde deren Detektion mit dem *Venor® GeM OneStep Kit* durchgeführt. Als Probe wurden 100µl Zellkulturüberstand je Zellklon bei einer Konfluenz von 90 bis 100% in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und für 5min bei 95°C in einem Heizblock inkubiert und anschließend bei 13.000rpm für 5sek zentrifugiert. 2µl des Überstandes wurden in der PCR nach Herstellerangaben eingesetzt, wie auch die Positiv- und Negativkontrolle, die dem Kit beilagen. Die mitgelieferten Primer amplifizierten dabei einen 267bp langen hochkonservierten Bereich der 16S rRNA des Mykoplasmen-genoms. Eine Interpretation eines zu erwartenden Ergebnisses war der Produktbeschreibung des Kits beigelegt. Die Analyse erfolgte durch ein 1,5%iges Agarosegel mit Ethidiumbromidzusatz bei 100V für 30min.

#### **4.7 Blastozysteninjektion**

Der Erfolg der Injektion wie auch des anschließenden Transfers ist von regelmäßiger Durchführung abhängig und erfolgte deshalb durch zwei Serviceteams des Helmholtz Zentrum München. Die Injektion von drei ES-Zellklonen der ROSA26-Linie in BDF1 (B6D2F1/J)-Blastozysten wurde von der *Animal Model Generation Group* des Instituts für Entwicklungs-genetik (IDG) des Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Der anschließende Transfer in 8 bis 10 Wochen alte pseudogravide Empfängertiere (Rezipienten) der Auszuchtlinie CrI:CD-1 (ICR)/DCM (Department of Comparative Medicine; CD-1) erfolgte durch das Embryotransfer- und Cryoservice-

Team der Abteilung für Vergleichende Medizin (AVM) des Helmholtz Zentrum München.

### ***Vorbereitung der ES-Zellen***

Die ES-Zellen wurden in 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in 9ml Kulturmedium bei 1.200rpm für 4min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die ES-Zellen auf einer 10cm Feederplatte ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden am darauffolgenden Tag mit 5ml PBS gewaschen und dann mit 2ml Trypsin bei 37°C für 5-10min abgelöst. Mit 4ml Kulturmedium wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und auf zwei 10cm gelatinierte Platten, auf die 10ml Kulturmedium vorgelegt wurden, aufgeteilt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 3ml PBS gewaschen und mit 3ml Trypsin bei 37°C für 4min abgelöst. Nach Resuspension in 4ml Medium und Zentrifugation bei 1.200rpm für 4min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 2ml Kulturmedium resuspendiert. Auf Eis gelagert wurden die Zellen zur Blastozysteninjektion dem Institut für Entwicklungsgenetik (Helmholtz Zentrum München) übergeben. Im Folgenden soll kurz auf die Injektions- und Transfermethoden zum besseren Verständnis eingegangen werden.

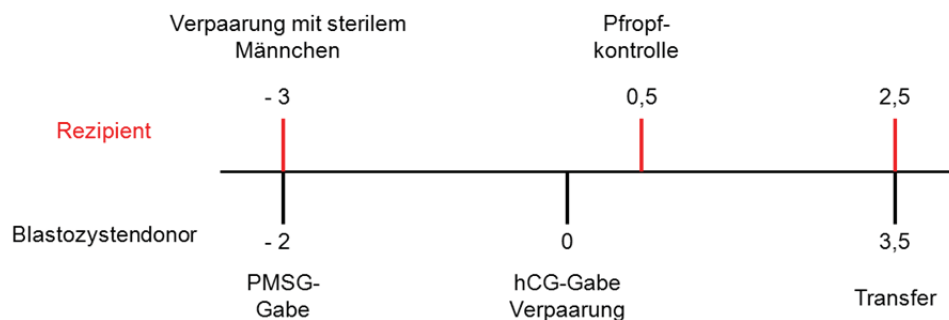
### ***Gewinnung der Blastozysten***

Die Blastozystengewinnung und die anschließende Injektion beziehen sich auf die Protokolle aus dem Buch „*Manipulating the Mouse Embryo*“ (Nagy, 2003). Diese wurde von der Arbeitsgruppe des Instituts für Entwicklungsgenetik (IDG) des Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Es wurden Mäuse des Hybrid-Mausstammes B6D2F1/J ((C57BL/6JxDBA2)F1) der Fa. Charles River verwendet. Drei Wochen alte Weibchen wurden mit *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG) und zwei Tage danach mit *human Chorionic Gonadotropin* (hCG) superovuliert und am gleichen Tag noch mit Männchen 1:1 verpaart (Abbildung 19). Die Tiere wurden am nächsten Tag getrennt und am Tag 3,5p.c. mit CO<sub>2</sub> getötet, der Uterus entnommen und zur Gewinnung der Blastozysten gespült.

### ***Gewinnung der pseudograviden Empfängertiere (Rezipienten)***

Als Rezipienten wurden 8 bis 10 Wochen alte Tiere der Auszuchtlinie Crl:CD-1 (ICR)/DCM (CD-1) von dem Embryotransfer- und Cryoservice-Team der AVM (Helmholtz Zentrum München) verwendet. Geschlechtsreife Weibchen wurden dazu

mit vasktomierten Männchen über einen Zeitraum von 3,5 Tagen verpaart (Abbildung 19). Vasktomierte Böcke erhält man durch das chirurgische Entfernen der Nebenhodenschwänze oder Durchtrennen der Samenleiter, wodurch infertile Tiere erzeugt werden, deren Libido durch Erhalt des Hodens und damit der Testosteronproduktion jedoch ungestört bleibt. Nach Verpaarung und zwei Tage vor der Blastozysteninjektion wurde die erfolgte Kopulation anhand der Vaginalpröpfe, einem eingedickten Sekret aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, makroskopisch überprüft (sog. *plug check*). Für den Transfer von Blastozysten sind die Weibchen geeignet, die den Plug zwei Tage vor dem geplanten Transfer aufweisen. Geht man von einer Kopulation in der Mitte der Dunkelphase aus und macht den Transfer um ca. 12 Uhr ist die Rezipientin 2,5 Tage p.c.



**Abbildung 19: Zeitverlauf der Hormonbehandlung und Verpaarung beim Embryotransfer.**

### **Injektion**

Bis zu 20 manipulierte, heterozygot transgene ES-Zellen wurden mit Hilfe einer Injektionskapillare in das Blastocoel von BDF1-Blastozysten vom IDG (Helmholtz Zentrum München) mikroinjiziert. Bis zum Transfer wurden die mikroinjizierten Blastozysten in M2-Medium bei 37°C auf einer Wärmeplatte gelagert.

### **Transfer der injizierten Blastozysten in Rezipienten**

Der Transfer der mikroinjizierten Blastozysten in die plug-positiven und damit pseudoschwangeren Rezipienten wurde am Tag 2,5p.c. von der Arbeitsgruppe der AVM (Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Dabei soll der unterschiedliche Entwicklungsstand von einem Tag zwischen Empfängertier und Blastozyste die Verzögerung der Embryonalentwicklung, die in vitro wie auch durch Manipulationen des Embryotransfers verursacht werden, kompensieren und damit den Anteil an Implantationen erhöhen. Bis zu 20 erfolgreich mikroinjizierte Blastozysten wurden in

das linke Uterushorn transferiert. Theoretisch wäre auch ein Transfer in beide Uterushörner möglich, jedoch ist die Belastung für das Tier dabei höher, da die Bauchhöhle in beiden Flanken eröffnet werden müsste. Bis zur Geburt der Nachkommen wurden die Rezipienten einzeln in *IVC- (individually ventilated cages)* Käfigen mit Nistmaterial (Zellstoff) und Maushaus gehalten. Nach einer Trächtigkeitsdauer von etwa 21 Tagen wurden die Nachkommen geboren und nach weiteren drei Wochen nach Geschlecht getrennt und mittels Ohrlochung markiert und von der Mutter abgesetzt. Die Genotypisierung erfolgte anschließend aus der Lysierung und Aufreinigung von Schwanzspitzenbiopsien.

#### **4.8 Gewinnung von genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien**

Für die Genotypisierung der entsprechenden Mauslinien wurde 3 Wochen alten Mäusen ein ca. 1-2mm langes Schwanzstück abgeschnitten. Die Schwanzspitzenbiopsie wurde in 500µl Lysispuffer bei 55°C unter Schütteln in einem Thermomixer für mind. 3 Stunden lysiert. Dabei wurden pro 1ml Lysispuffer 15µl Proteinase K unmittelbar vor Gebrauch zugegeben. Nach vollständiger Auflösung des Gewebes wurden 300µl Phenol-Chloroform zugegeben, vorgetext und bei 13.000rpm bei 4°C für 10min zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurden 200µl der oberen, wässrigen Phase in ein neues Eppendorfgefäß gegeben, das bereits 500µl einer Ethanol/NaCl-Mischung (15µl 5M NaCl pro 1ml 100% Ethanol) enthielt. Nach Mischen und Zentrifugation bei 13.000rpm für 10min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 400µl 70% Ethanol gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10min bei 13.000rpm und 4°C. Der Überstand wurde danach wieder verworfen und das Pellet nach Trocknung in 80µl TE-Puffer aufgenommen. Für die Genotypisierungs-PCR wurde 1µl dieser genomischen DNA-Lösung verwendet.

#### **4.9 Testen von Chimären auf Keimbahngängigkeit**

Die Testung der sich aus den transferierten Blastozysten entwickelten Chimären auf Keimbahngängigkeit und damit auf Weitergabe des Transgens an nachfolgende Generationen erfolgte durch Rückkreuzung mit C57BL/6N/DCM Wildtypmäusen im Alter von sieben bis acht Wochen. Sowohl die Chimären der ROSA26-Linie, als auch

die F1-Generation wurde mit der ROSA26 ES Screen-PCR sowie der PCR zur Überprüfung der pA-site und der STOP-*Txnrd2*-Kassette genotypisiert.

#### **4.10 Tierhaltung**

Die Mäuse wurden in einer spezifiziert pathogenfreien (SPF)-Barrierehaltung in einzeln belüfteten Käfigen (*individually ventilated cages (IVCs)* der Fa. Tecniplast) in vollklimatisierten Räumen bei einer Temperatur von  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , einer Luftfeuchte von  $55\% \pm 10\%$  und einem zwölfstündigen Hell-/Dunkel-Zyklus gezüchtet und gehalten. Der Zutritt zum Barrierebereich erfolgte über eine Luftdusche und die Mitarbeiter trugen autoklavierte Kleidung, Einmalhandschuhe, Kopfhauben und Mundschutz im Tierbereich. Alle Materialien wurden vor der Verwendung im Tierbereich autoklaviert oder chemisch desinfiziert und die Tiere wurden unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 mit Silikon gepolsterten desinfizierten Pinzetten in frische Käfige umgesetzt. Die Mäuse bekamen Holzspäne als Einstreu und erhielten eine Standarddiät für Nager und sterilfiltriertes teilentmineralisiertes Wasser ad libitum. Ein Hygienemonitoring erfolgte im zwölfwöchigen Turnus mittels *dirty-bedding*-Sentinels nach den Empfehlungen der FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) (Nicklas et al., 2002).

#### **4.11 Zucht und Kreuzung der transgenen Linien**

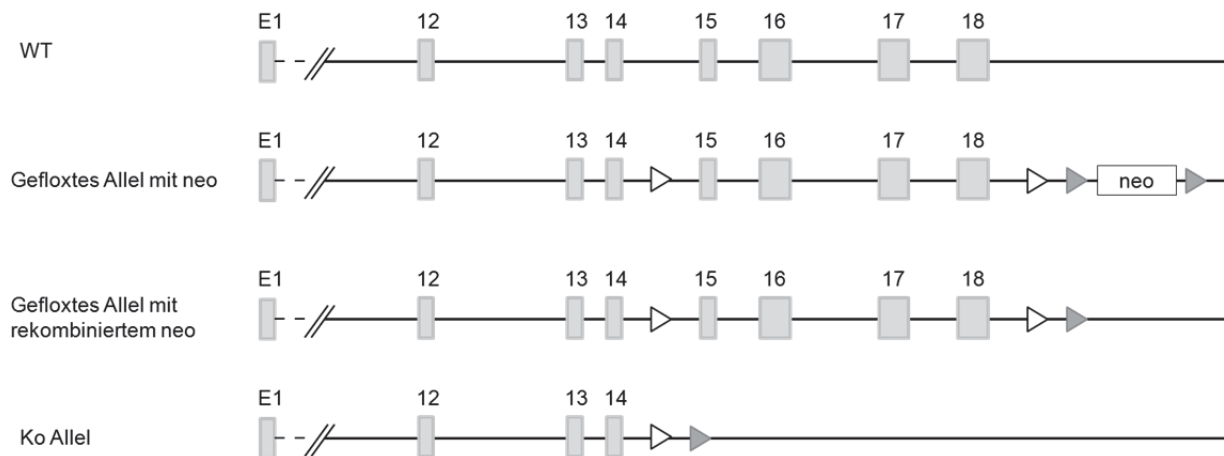
##### **4.11.1 Pankreasspezifische *Txnrd2* knockout-Linie**

Die Zucht des pankreasspezifischen *knockouts* der mitochondrialen Thioredoxinreduktase wurde nach Reimport eines Zuchtpaares (Dr. Einwächter, Klinikum rechts der Isar, TUM) wieder aufgenommen. Dabei wurde eine Cre-rekombinante Mauslinie mit einer *Txnrd2*-gefloxten Linie gekreuzt.

##### **4.11.2 Gefloxt mitochondriale Thioredoxinreduktase Mauslinie**

Die Mauslinie wurde von Conrad und Mitarbeitern (Conrad et al., 2004) generiert. Das Gen der mitochondrialen Thioredoxinreduktase besteht aus 18 Exons, die eine Region von 57kb überspannt. Die letzten vier Exons beinhalten das C-terminal lokalisierte katalytische Zentrum. Dabei befindet sich das Sec-Codon UGA auf Exon 17 und das SECIS-Element, für die Inkorporation von Sec, sowie das Terminations-

signal der Translation auf Exon 18. Durch die Cre-vermittelte Rekombination der loxP-Stellen, die die Exons 15 bis 18 und damit die enzymatische Domäne von *Txnrd2* flankieren, erfolgt die Inaktivierung von *Txnrd2* (Abbildung 20). Die neo-Kassette hinter Exon 18, die für die Selektion der ES-Zellklone eingefügt wurde, wurde durch spätere Flp vermittelte Rekombination entfernt.



**Abbildung 20: Schema zur Generierung der geflochten *Txnrd2*-Linie.** Die loxP-Sequenzen (weiße Dreiecke) flankieren die Exons 15 bis 18 und die für die Selektion der ES-Zellklone eingefügte neo-Kassette wird von FRT-sites (graue Dreiecke) umspannt. Die neo-Kassette wird durch Flp vermittelte Rekombination entfernt und durch Kreuzung mit einer Cre-rekombinanten Mauslinie erfolgt die Rekombination der loxP-Sequenzen und damit der *knockout* von *Txnrd2* durch Entfernung der Exons 15 bis 18 (Schema modifiziert nach (Conrad et al., 2004)).

Die Genotypisierung erfolgte per PCR (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Reaktionsbedingungen zur Genotypisierung der geflochten mitochondrialen Thioredoxinreduktase Mauslinie.**

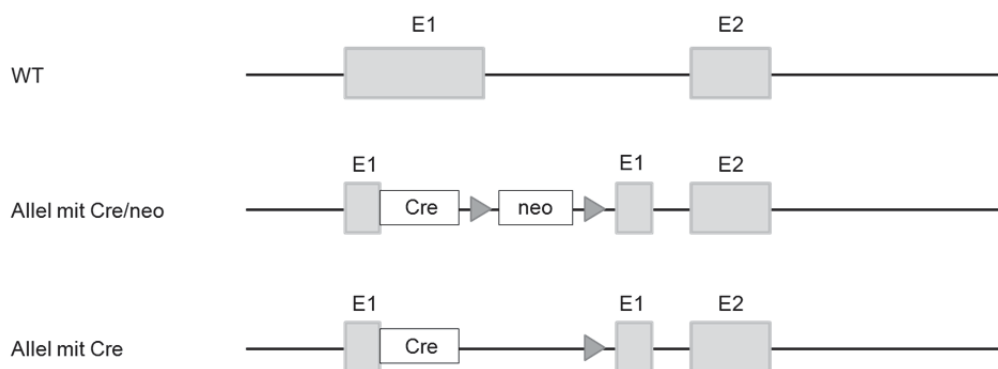
Ansatz	TR3flox1	1,5µl
	TR3flox2	1,5µl
	10xPuffer	2,5µl
	2xdNTPs	5,0µl
	MgCl <sub>2</sub>	1,5µl
	DNA	1,0µl
	Taq (Invitrogen)	0,1µl
	dH <sub>2</sub> O	11,9µl
	Gesamtvolumen	25µl



Bedingungen	95°C	4min	} 40 Zyklen
	95°C	45sek	
	60°C	30sek	
	72°C	30sek	
	72°C	7min	
	25°C	Pause	

#### 4.11.3 Ptf1a-Cre<sup>tg/wt</sup> Mauslinie

Für ein pankreasspezifisches Ausschalten der *Txnrd2* wurde eine *knockin*-Linie verwendet. Bei dieser wurde das Gen Ptf1a (auch bekannt als PTF1-p48) modifiziert. Ptf1a codiert für eine von drei Untereinheiten des Pankreas-Transkriptionsfaktors (PTF1) (Roux et al., 1989; Beres et al., 2006) für die Entwicklung des exokrinen und endokrinen Pankreas in Mäusen (Krapp et al., 1998; Kawaguchi et al., 2002). Der codierende ORF (*open reading frame*) für die Cre-Rekombinase wurde in das Exon 1 im Leserahmen (*in frame*) einkloniert (Nakhai et al., 2007) (Abbildung 21). Die neo-Kassette zur Selektion positiver ES-Zellklone wurde ebenfalls durch eine Flp-vermittelte Rekombination vor der Blastozysteninjektion entfernt. Mit der Expression der Cre-Rekombinase unter dem Einfluss des Ptf1a-Promotors war eine Pankreas-spezifität gegeben und ermöglichte damit den gewebsspezifischen *knockout* der mitochondrialen Thioredoxinreduktase nach Kreuzung der beiden Linien.



**Abbildung 21: Schema Ptf1a-Cre<sup>tg/wt</sup> Mauslinie.** Die neo-Kassette zur Selektion der ES-Zellklone wurde durch Flp vermittelte Rekombination der FRT-sites (graue Dreiecke) entfernt. (Schema modifiziert nach (Aichler, 2007)).



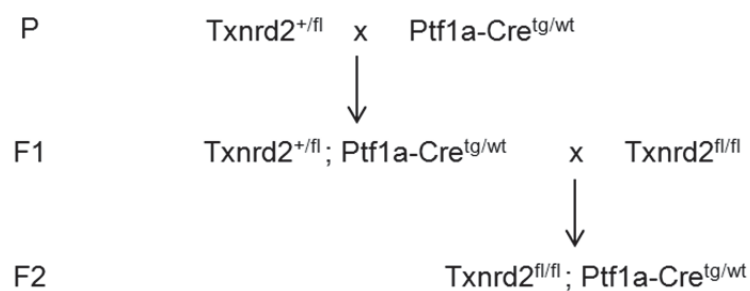
Die Genotypisierung erfolgte per PCR (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Reaktionsbedingungen zur Genotypisierung der *Ptf1a-Cre<sup>tg/wt</sup>* Mauslinie.**

Ansatz	TetOcre1	1,5µl
	TetOcre2	1,5µl
	TetOcre3	1,5µl
	TetOcre4	1,5µl
	10xPuffer	2,5µl
	2xdNTPs	5,0µl
	MgCl <sub>2</sub>	1,5µl
	DNA	1,0µl
	Taq (Invitrogen)	0,1µl
	dH <sub>2</sub> O	8,9µl
	Gesamtvolumen	25µl
Bedingungen	94°C 3min	} 34 Zyklen
	94°C 1min	
	60°C 2min	
	72°C 3min	
	72°C 10min	
	25°C Pause	

### ***Pankreasspezifischer *Txnrd2* knockout***

Zur Generierung der pankreasspezifischen *Txnrd2* knockout-Linie wurde die gefloxtete *Txnrd2* mit der Cre-rekombinanten Linie unter Einfluss des *Ptf1a*-Promotors gekreuzt (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Kreuzungsschema zur Generierung des pankreasspezifischen *Txnrd2* knockouts.** In der F2 Generation erhält man den pankreasspezifischen *Txnrd2* knockout (Schema modifiziert nach (Aichler, 2007)).

Die pankreasspezifische Cre-Expression wurde außerdem durch Kreuzung der *Txnrd2-knockout* Linie mit der Reportermauslinie Gt(ROSA)26Sortm1Sor (R26R) (Soriano, 1999) von Aichler und Mitarbeitern bestätigt (Aichler, 2007). Da die Reporterlinie ein modifiziertes LacZ-Gen mit vorgeschalteter loxSTOPlox-Kassette enthält, werden durch  $\beta$ -gal Färbung die Zellen markiert, in denen Ptf1a-vermittelte Cre-Rekombination stattfindet. Hierbei zeigte sich, dass die Färbung auf das Pankreasgewebe beschränkt ist. Ebenso wurde die effektive pankreasspezifische Ausschaltung der mitochondrialen Thiothredoxinreduktase noch auf DNA- und mRNA-Ebene bestätigt (Aichler, 2007).

### **CAGGs-Dre Mauslinie**

Die CAGGs-Dre (EMMA-Bezeichnung: Tg(CAG-dre)1Afst) transgene Maus wurde von Stewart und Mitarbeitern (Anastassiadis et al., 2009) generiert. Dabei wird die Dre-Rekombinase unter Einfluss des ubiquitären CAGGs-Promotors gebracht, der sich durch ein hohes Expressionsniveau auszeichnet. Die Bestätigung der voneinander unabhängigen Rekombinationssysteme Dre/rox und Cre/loxP ohne jegliche Kreuzrekombination wurde sowohl in vivo also auch in vitro erbracht.

Embryonen im 2-Zell-Stadium, erhalten von EMMA (*European Mouse Mutant Archive*), wurden durch das Embryotransfer- und Cryoservice-Team der Abteilung für Vergleichende Medizin (AVM) des Helmholtz Zentrum München in 8 bis 10 Wochen alte Rezipienten der Auszuchtlinie Crl:CD-1 (ICR)/DCM transferiert. Die Nachkommen wurden durch Genotypisierung auf CAGGs-Dre untersucht (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Reaktionsbedingungen zur Genotypisierung der CAGGs-Dre Mauslinie.**

Ansatz	CAGGs-Dre3	1,0 $\mu$ l
	CAGGs-Dre4	1,0 $\mu$ l
	5xQ-Solution	2,5 $\mu$ l
	10xPuffer	2,5 $\mu$ l
	2xdNTPs	5,0 $\mu$ l
	MgCl <sub>2</sub>	1,5 $\mu$ l
	DNA	2,0 $\mu$ l
	Hot star taq	0,3 $\mu$ l
	dH <sub>2</sub> O	9,2 $\mu$ l
	Gesamtvolumen	25 $\mu$ l

Bedingungen	95°C	5min	}	35 Zyklen
	94°C	30sek		
	58°C	30sek		
	68°C	1min		
	68°C	10min		
	25°C	Pause		

#### 4.12 In vivo Prüfung des ROSA26-Transgens

Der Genotyp der F1-Nachkommen (Verpaarung aus ROSA26<sup>tg/+</sup> und CAGGs-Dre<sup>tg/wt</sup>) wurde durch CAGGs-Dre PCR (Tabelle 16) und durch ROSA26 PCR (Tabelle 17) geprüft.

**Tabelle 17: Reaktionsbedingungen ROSA26-PCR.**

Ansatz	R26-Tva-GT-UP	0,6µl
	R26-Tva-GT-SA-mut-LP	0,4µl
	R26-Tva-GT-WT-LP	1µl
	DNA	2µl
	REDTaq ReadyMix	15µl
	dH <sub>2</sub> O	11µl
	Gesamtvolumen	30µl

Bedingungen	95°C	3min	}	40 Zyklen
	95°C	45sek		
	62°C	1min		
	72°C	1min 30sek		
	72°C	10min		
	25°C	Pause		

##### 4.12.1 β-gal Färbung der Embryonen

Embryonen aus der Verpaarung ROSA26<sup>tg/+</sup> x CAGGs-Dre<sup>tg/wt</sup> wurden am Tag E14.5 β-gal gefärbt. Nach Entnahme wurden die Embryonen in 4%igen PFA unter Schütteln bei 4°C für 90min fixiert. Nach dem Fixieren folgten drei Waschschrte für je 30min in LacZ-Waschpuffer ebenfalls unter Schütteln bei 4°C. Lichtgeschützt wurden die Embryonen in der LacZ-Färbelösung bei 37°C gefärbt und anschließend dreimal für je 10min in PBS gewaschen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Klonierung

Für die Integration der beiden Targetingkonstrukte in das Mausgenom wurden zwei Loci gewählt, die für diesen Zweck besonders geeignet erschienen. Zum einen der ROSA26 (R26)-Lokus für die Integration des *Txnrd2-knockins* und zum anderen der Hprt-Lokus für die Integration des induzierbaren Dre-Rekombinase Systems. Beide Genloci haben den Vorteil, dass sie leicht zugänglich sind und ubiquitär exprimieren. Die Besonderheit des Hprt-Lokus ist zudem die X-chromosomale Lage aufgrund derer er selbst als Selektionsmarker verwendet werden kann. Für die parallele Klonierung der beiden komplexen Targetingkonstrukte pROSA26-roxSTOPprox-Txnrd2-IresLacZ (Abbildung 23) und pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 (Abbildung 25) wurden mehrere Ausgangsplasmide modifiziert und anschließend sukzessive miteinander kombiniert. Ziel dabei war die Generierung eines *knockins* zum *rescue* des pankreasspezifischen *knockouts* der mitochondrialen Thioredoxinreduktase (*Txnrd2*). Dabei wird Dre aus dem im Hprt-Lokus befindlichen CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 durch Entfernung der vorgeschalteten STOP-Kassette durch die Expression der Ptf1a-Promotor getriebenen und damit pankreasspezifischen Cre-Rekombinase in der Embryonalphase aktiviert und gelangt nach Tamoxifeninduktion in den Zellkern. Dort rekombiniert es die rox-sites unter Entfernung der vor *Txnrd2*-IresLacZ geschalteten STOP-Kassette, was die Expression von *Txnrd2*-IresLacZ bedingt und somit zum genetischen *rescue* der mitochondrialen Thioredoxinreduktase des pankreasspezifischen *knockouts* führt.

#### 5.1.1 Klonierung von pROSA26-roxSTOPprox-Txnrd2-IresLacZ



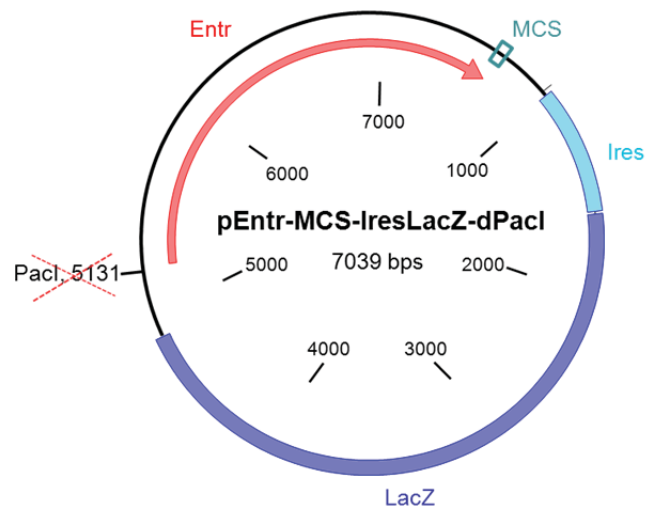
**Abbildung 23: Schema des Targetingvektors für den ROSA26-Lokus.** Die Expression von *Txnrd2*-IresLacZ wird durch die mit rox-sites flankierte STOP-Kassette verhindert.

Die einzelnen Schritte der Klonierung des pROSA-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ Konstrukts (Tabelle 18) waren folgende:

Tabelle 18: Einzelschritte zum Erhalt des Targetingvektors pROSA-roxSTOProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ.					
Schritt Nr.	Plasmid	Modifikation	Insert	Modifikation	Zweck
1	pEntr-MCS-IresLacZ	PacI-Verdau und Religation			Zerstörung der PacI-Schnittstelle zur späteren Linearisierung des Endvektors
2	pEntr-MCS-IresLacZ-dPacI	FspAI -Verdau und Dephosphorylierung	pMC442- <i>Txnrd2</i> -IRES-puro	EcoRI/SnaBI-Verdau	Ligation zu pEntr- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ
3	pEntr-roxSTOProx-MCS	AscI/AatII-Verdau	pEntr- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ	AscI/AatII-Verdau	Ligation zu pEntr-roxSTOProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ
4	RosaRFA		pEntr-roxSTOProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ		Klonase Reaktion zum Targetingvektor pROSA-roxSTOProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ

Als Ausgangsvektor für die weiteren Klonierungen wurde der Vektor pEntr-MCS-IresLacZ verwendet. In diesem waren bereits eine MCS (*multiple cloning site*) zur Einklonierung sowie ein ATG-Startcodon, das die Ires (*internal ribosomal entry site*)-vermittelte Translation der  $\beta$ -Galaktosidase ermöglichen soll, vorhanden. Im Hinblick auf die noch folgende Elektroporation des Zielvektors (Targetingvektor) in ES-Zellen ist es bereits im Bezug auf die Klonierungsstrategie wichtig, die Möglichkeit für eine spätere Linearisierung des Targetingvektors mit einem funktionstüchtigen einmal-schneidenden Enzym einzuplanen. Die Linearisierung erhöht dabei die Aufnahme der Fremd-DNA in ES-Zellen und damit auch die Wahrscheinlichkeit des Rekombinationsereignisses. Die Wahl fiel auf eine PacI-Schnittstelle, die zu einem späteren Zeitpunkt einkloniert wird. Damit diese einmalig ist, muss die vorhandene zweite PacI-Schnittstelle bereits in einem frühen Stadium entfernt werden. Deshalb folgte ein *blunt end* Verdau des Klonierungsvektors pEntr-MCS-IresLacZ mit PacI zur Zerstörung der PacI-Schnittstelle, da im späteren Endvektor, der die für die homologe Rekombination notwendigen homologen Arme besitzt, bereits eine PacI-

Schnittstelle vorhanden war. Das durch *blunt end* Religation verbundene Plasmid pEntr-MCS-IresLacZ-dPacI (dPacI = Deletion der PacI-Schnittstelle) wurde auf Verlust der PacI-Schnittstelle durch PacI und XhoI Testverdau (Checkverdau) und Sequenzierung mit M13-RP geprüft.

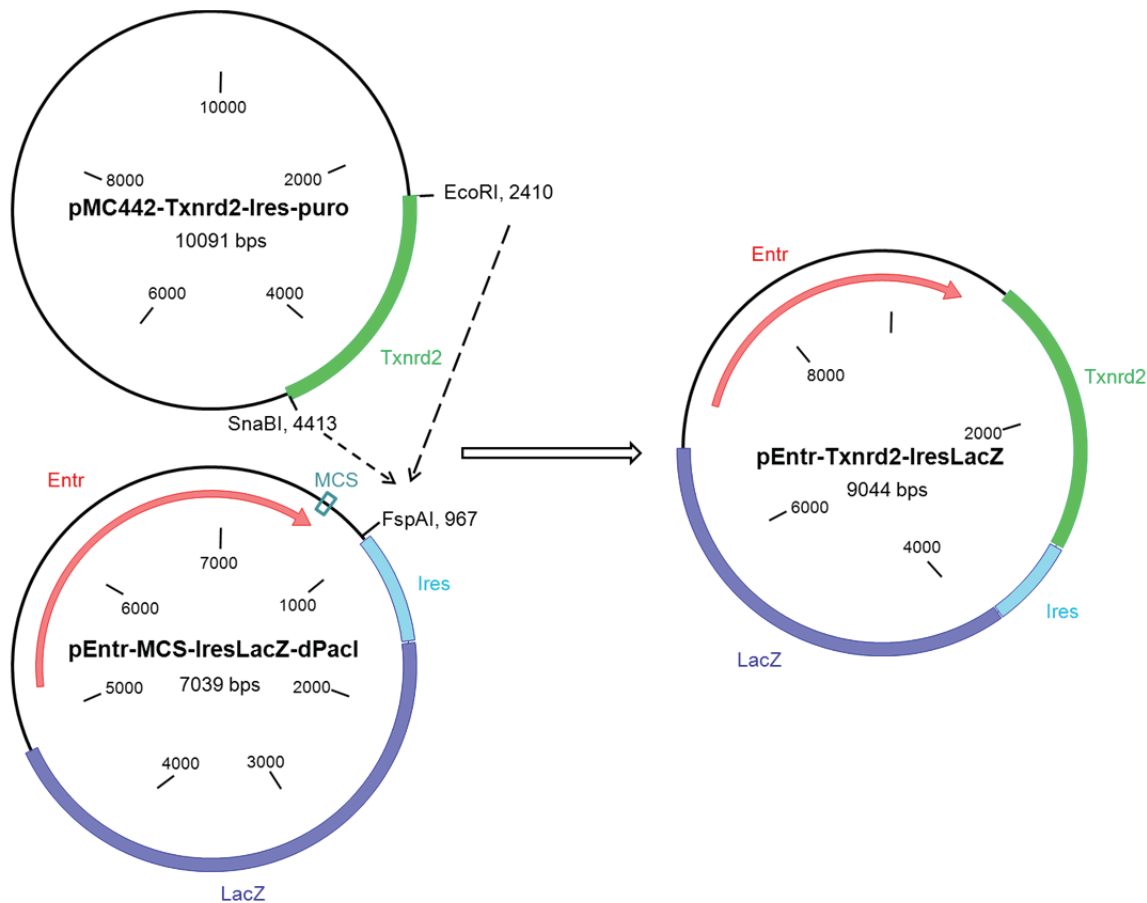


**Schritt 1:** pEntr-MCS-IresLacZ (PacI) religiert zum Verlust der PacI-Schnittstelle für spätere Linearisierung des Targetingvektors. Der Vektor pEntr-MCS-IresLacZ-dPacI entsteht.

In dieses wurde nach Verdau mit einem *blunt end* Einfachschneider (FspAI) und anschließender Dephosphorylierung über die 5' von der Ires liegenden FspAI-Schnittstelle und 3' der Spleiß-Akzeptor (SA) Sequenz *Txnrd2* eingebracht.

Die spätere Integration der roxSTOPprox(rsr)-*Txnrd2*-IresLacZ-Kassette erfolgt in das Intron1 des ROSA26-Lokus. Nach Transkription durch den ROSA26-Promotor wird das entstandene primäre RNA-Transkript im Kern so gespleißt, dass der SA vor der rox-site die Fusion der integrierten Kassette an das Exon 1 vermittelt. Wäre kein SA vorhanden, würde die gesamte Kassette mitsamt Intron 1 entfernt werden, da dann Exon 1 an Exon 2 gespleißt werden würde. Bei nicht deletierter rsr-Kassette entsteht ein primäres RNA-Transkript mit Exon 1 und dem STOP-Element, bis zum Abbruch an der Polyadenylierungsstelle (pA-site) der STOP-Kassette. Somit kommt es zur Expression des neo-Resistenzgens, aber nicht von *Txnrd2*-IresLacZ während der Selektion. Bei deletierter rsr-Kassette erfolgt die Transkription von Exon 1, rox, *Txnrd2*-IresLacZ. Somit erfolgt die Transkription von *Txnrd2*-IresLacZ als Einheit.

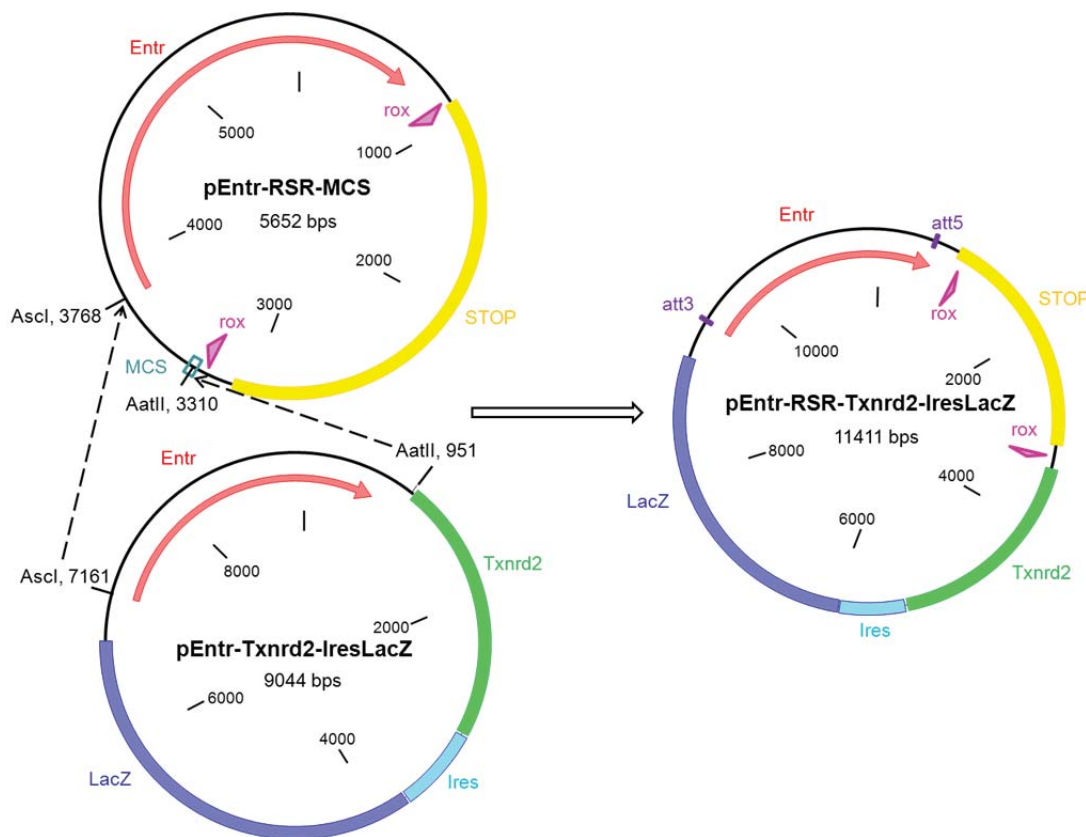
Das *Txnrd2* Insert mit FLAG- und Strep-Tags stammte dabei aus dem mit EcoRI und SnaBI verdauten Plasmid pMC442-*Txnrd2*-Ires-puro mit Ampicillinresistenz. Das Insert mit *Txnrd2* wurde mit angehängten FLAG- und Strep-Tags über ein präparatives Gel vom Donorplasmid getrennt. Nach Gelelution erfolgte ein Glätten der durch Verdau entstandenenden Enden für die nachfolgende *blunt end* Ligation mit dem kanamycinresistenten Plasmid pEntr-MCS-IresLacZ-dPacl. Dabei wurde sich zur Erhöhung der Effizienz der Ligation von glatten Enden eines Resistenzwechsels der Vektoren bedient. Der entstandene Klonierungsvektor pEntr-*Txnrd2*-IresLacZ wurde auf vollständige und gerichtete Ligation durch XhoI Checkverdau und Sequenzierung mit M13-RP geprüft.



**Schritt 2:** Einklonierung von *Txnrd2* aus pMC442-*Txnrd2*-Ires-puro (EcoRI/SnaBI) in pEntr-MCS-IresLacZ-dPacl (FspAI).

Für das Einklonieren der bis dahin noch fehlenden roxSTOPProx-Kassette wurde das *Txnrd2*-IresLacZ-Insert aus pEntr-*Txnrd2*-IresLacZ (AscI/AatII) über ein präparatives Gel mit anschließender Gelelution mobilisiert. Anschließend wurde es in den zur Verfügung gestellten Vektor pEntr-roxSTOPProx-MCS, der bereits 5' der STOP-

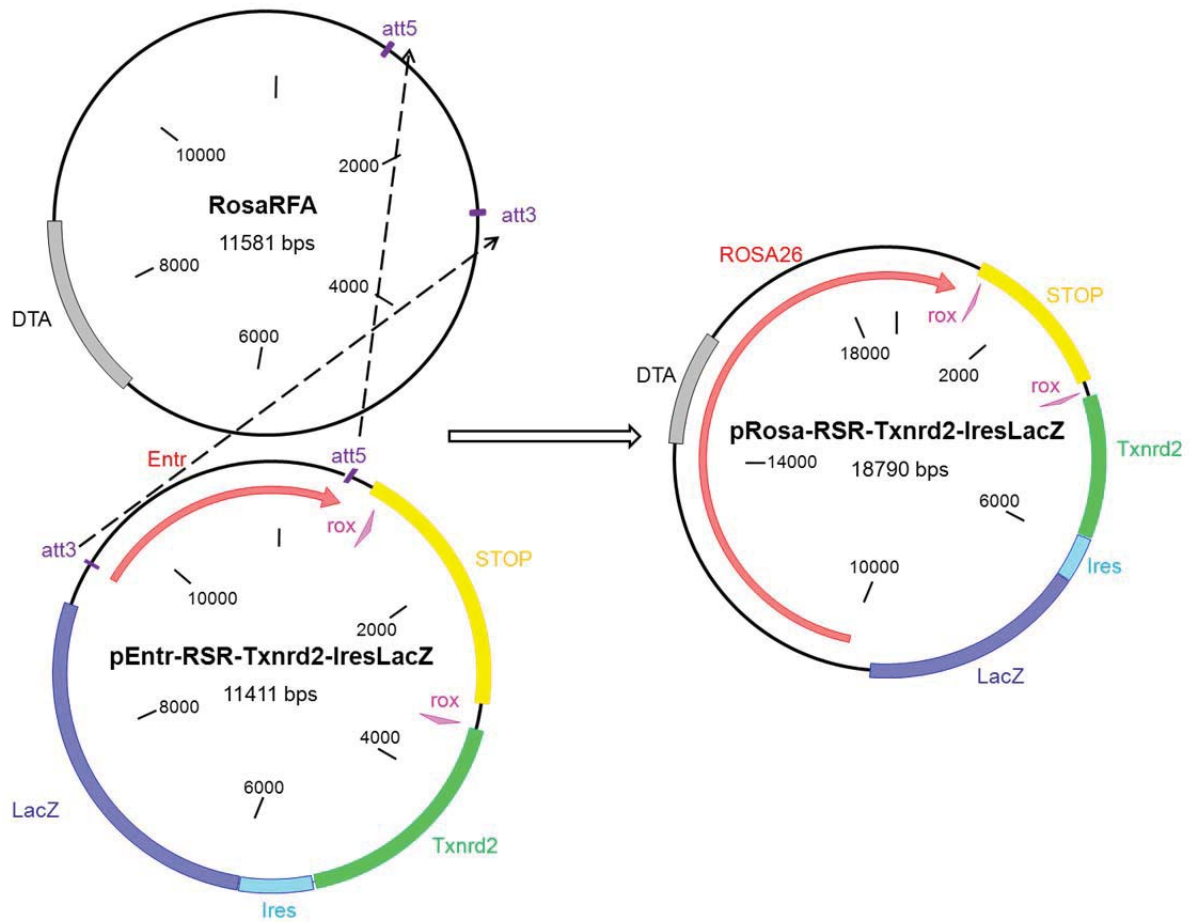
Kassette eine PGK-neo-Kassette enthält, 3' der roxSTOPProx-Kassette platziert. Auch das Akzeptorplasmid wurde für die Ligation durch *Ascl*- und *AatII*-Verdau über ein präparatives Gel aufgereinigt und nach anschließender Gelelution dephosphoryliert. Das Einfügen erfolgte *sticky end* und die Prüfung des entstandenen Plasmids pEntr-roxSTOPProx-*Txnrd2*-IresLacZ wurde durch *SmaI*-Testverdau und anschließender Sequenzierung mit den Primern pBroad-5268-LP und pGL3-pA-Pause-UP durchgeführt.



Schritt 3: Einklonierung von *Txnrd2*-IresLacZ aus pEntr-*Txnrd2*-IresLacZ (*AatII*/*Ascl*) in pEntr-roxSTOPProx-MCS (*AatII*/*Ascl*).

Durch die Invitrogen Gateway Klonase Reaktion von RosaRFA als Endvektor, der die für die homologe Rekombination in den R26-Lokus erforderlichen kurzen und langen Arme enthält, und pEntr-roxSTOPProx-*Txnrd2*-IresLacZ entstand der Targetingvektor pROSA-roxSTOPProx-*Txnrd2*-IresLacZ. Geprüft wurde das Plasmid mit einem *XhoI*-Verdau und der Targetingvektor wurde für die spätere ES-Zell Elektroporation vorbereitet.



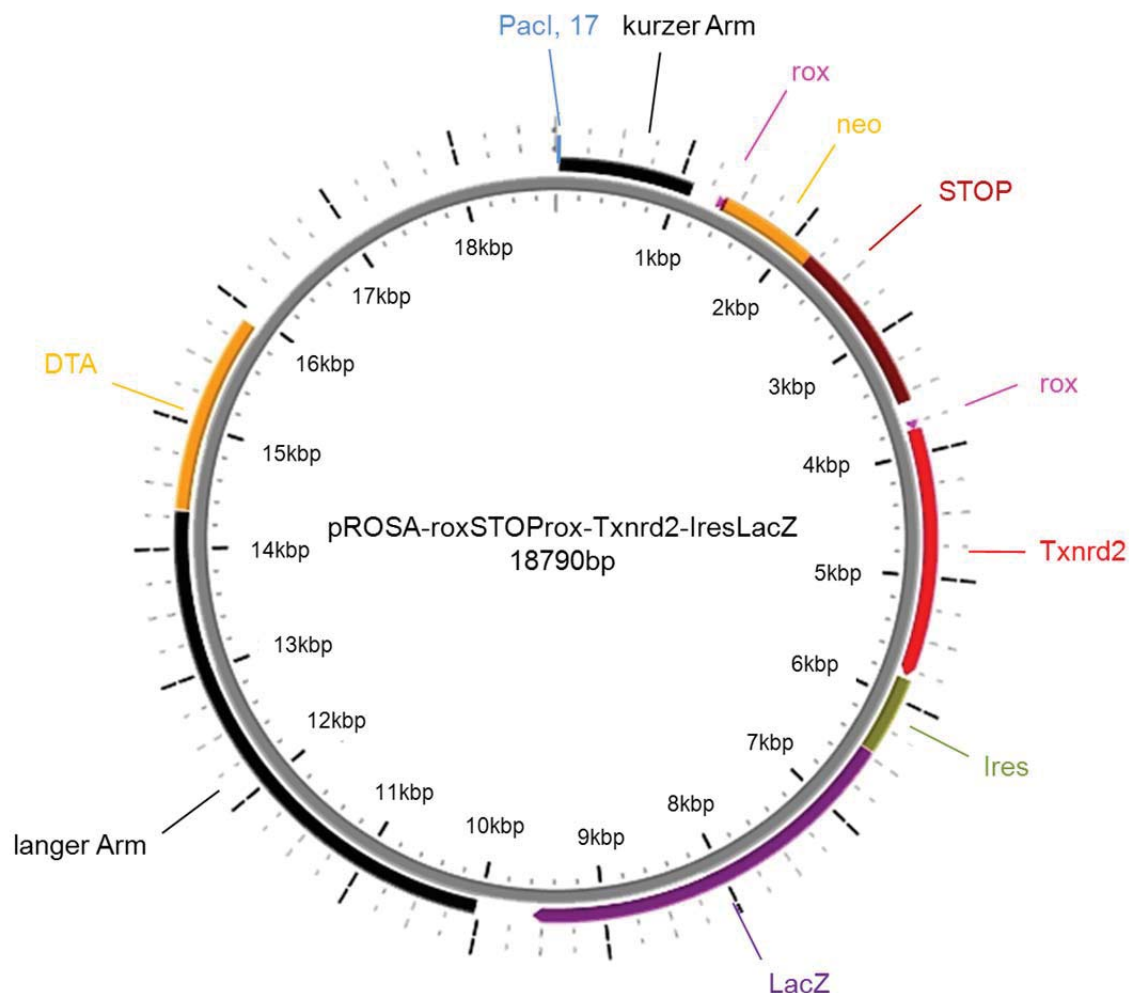


Schritt 4: Klonase-Reaktion von pEntr-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ und RosaRFA.

Das Endergebnis dieser Klonierung ist das Konstrukt pROSA-roxSTOPprox-*Txnrd2*-IresLacZ (Abbildung 24), das zur Rekombination des R26-Lokus der ES-Zellen verwendet wurde.

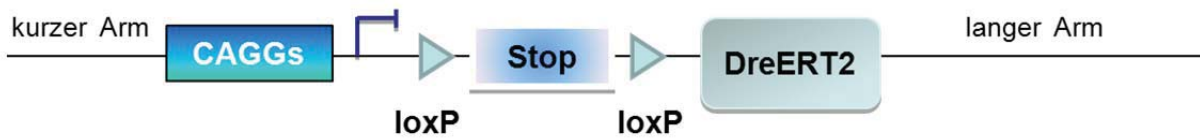
Die einzelnen Bestandteile dieses Targetingvektors sind:

- kurzer/langer Arm: genomische ROSA26-Sequenz für die ortskorrekte Integration.
- roxSTOProx: rox flankiertes STOP-Element, das die Expression des nachgeschalteten *Txnrd2*-ORFs (*open reading frame*) verhindert. Die STOP-Kassette ist durch die Dre-Aktivität entfernbar.
- neo/DTA: positiver bzw. negativer Selektionsmarker zur Selektion homolog rekombinierter ES-Zellen.
- *Txnrd2*-IresLacZ: ORF zur Expression von *Txnrd2* und LacZ mit Ires (*internal ribosomal entry site*) zur Co-Expression des Reportergens LacZ.
- PacI: Restriktionsschnittstelle zur Linearisierung des Targetingvektors.



**Abbildung 24:** Targetingvektor **pROSA-roxSTOProx-Txnrd2-IresLacZ** zur homologen Rekombination in den ROSA26-Lokus.

### 5.1.2 Klonierung von pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2



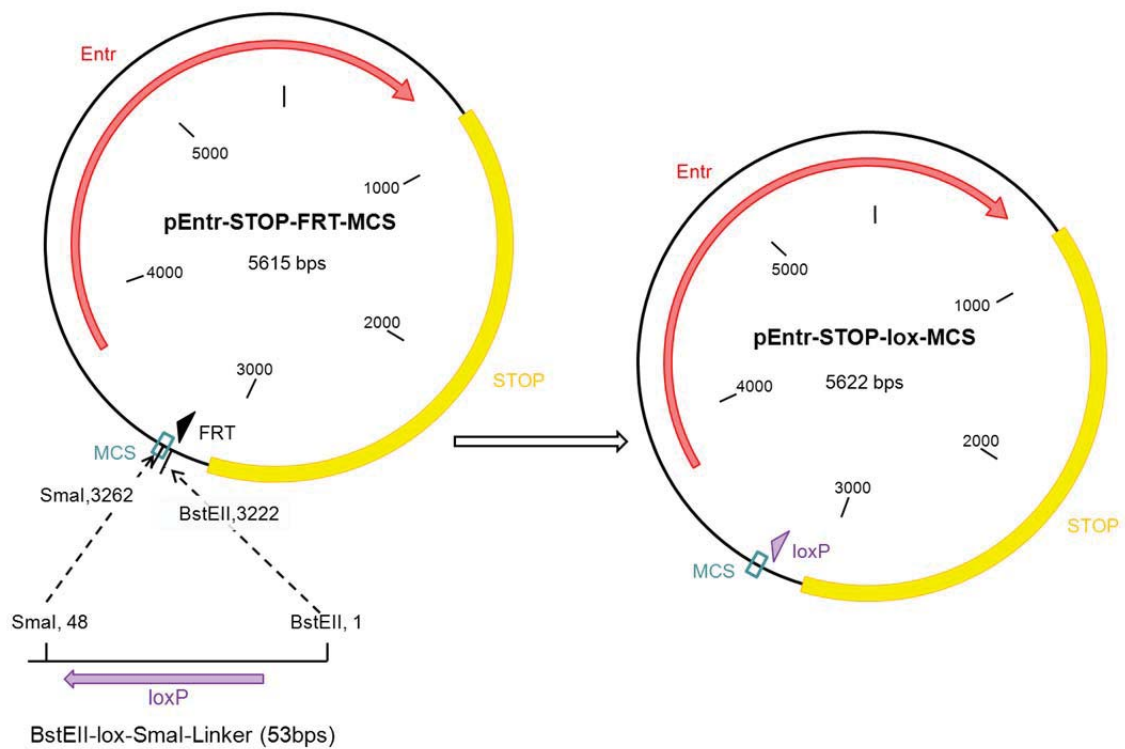
**Abbildung 25: Schema des Targetingvektors für den Hprt-Lokus.** Die Expression von DreERT2 durch den CAGGs-Promotor wird durch die vorangeschaltete, gefloxtete STOP-Kassette verhindert. Durch die Fusion mit ERT2 wird Dre erst durch Tamoxifenbindung an die Steroidbindedomäne ERT2 aktiviert und gelangt in den Zellkern. Somit ist eine zeitliche Induktion des *knockins* möglich.

Die einzelnen Schritte der Klonierung des pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 Konstrukts (Tabelle 19) waren folgende:

Tabelle 19: Einzelschritte zum Erhalt des Targetingvektors pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2.					
Schritt Nr.	Plasmid	Modifikation	Insert	Modifikation	Zweck
1	pEntr-STOP-FRT-MCS	BstEII/SmaI-Verdau und Dephosphorylierung	BstEII-lox-SmaI-Linker		Verlust der FRT-site und Erhalt der loxP-Stelle im Plasmid pEntr-STOP-lox-MCS nach Ligation
2	pEntr-STOP-lox-MCS	PmeI/SmaI-Verdau und Religation			Zerstörung der PmeI-Schnittstelle zur späteren Linearisierung des Endvektors
3	pEntr-STOP-lox-MCS-dPmeI	SacI/AscI-Verdau und Dephosphorylierung	SacI-BsiWI-AgeI-AscI-Linker		Ligation zu pEntr-STOP-lox-MCS-BsiWI
4	pEntr-STOP-lox-MCS-BsiWI	XhoI/EcoRI-Verdau und Dephosphorylierung	XhoI-SbfI-Sall-AvrII-SmaI-lox-EcoRI-Linker		Ligation zu pEntr-loxSTOPlox-MCS
5	pEntr-MCS-Blue	SmaI-Verdau und Dephosphorylierung	Dre	Dre-Amplifikation am Plasmid pCAGGs-Dre	pEntr-Dre
6	pBlueskript-ERT2	XhoI/PspOMI-Verdau	pEntr-Dre	XhoI/PspOMI-Verdau	Ligation zu pBlueskript-DreERT2

7	pEntr-loxSTOPlox-MCS	Pfol-Verdau und Dephosphorylierung	pBlueskript-DreERT2	Pfol-Verdau	Ligation zu pEntr-loxSTOPlox-DreERT2
8	pEntr-loxSTOPlox-DreERT2	Sall-HF/AvrII-Verdau und Dephosphorylierung	pCAGGs-Dre	Sall-HF/XbaI-Verdau	Ligation zu pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2
9	pDTA-Hprt	BsiWI/NsiI-Verdau	pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2	SbfI-HF/Eco53kI-Verdau	Ligation zum Targetingvektor pDTA-Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2

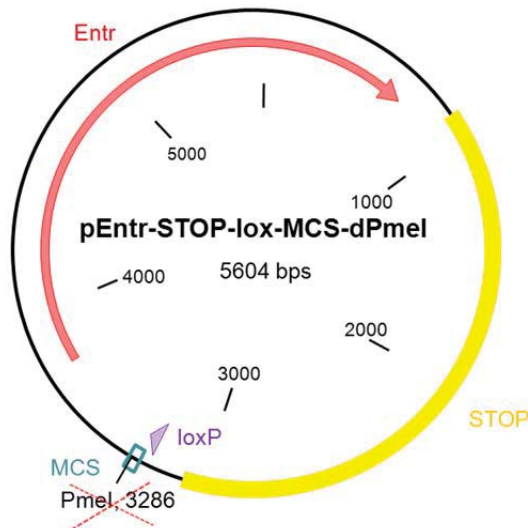
Für die Klonierung der loxSTOPloxDreERT2-Kassette wurde zunächst in den mit BstEII und SmaI verdauten und dephosphorylierten Klonierungsvektor pEntr- STOP-FRT-MCS ein BstEII-lox-SmaI-Linker *sticky end* eingefügt. Das dabei entstandene Plasmid pEntr-STOP-lox-MCS verliert somit die störende FRT-Sequenz und erhält die gewünschte loxP-Stelle. Die Überprüfung erfolgte durch Testverdau mit SmaI und XhoI und nachfolgender Sequenzierung mit den Primern pGL3-pA-Pause-UP und BrpA-LP. Die STOP-Kassette enthält 5' bereits eine PGK-neo-Kassette für die spätere positive Selektion der homolog rekombinierten ES-Zellklone.



### Schritt1: Einklonierung des BstEII-lox-Sma-Linkers in pEntr-STOP-FRT-MCS

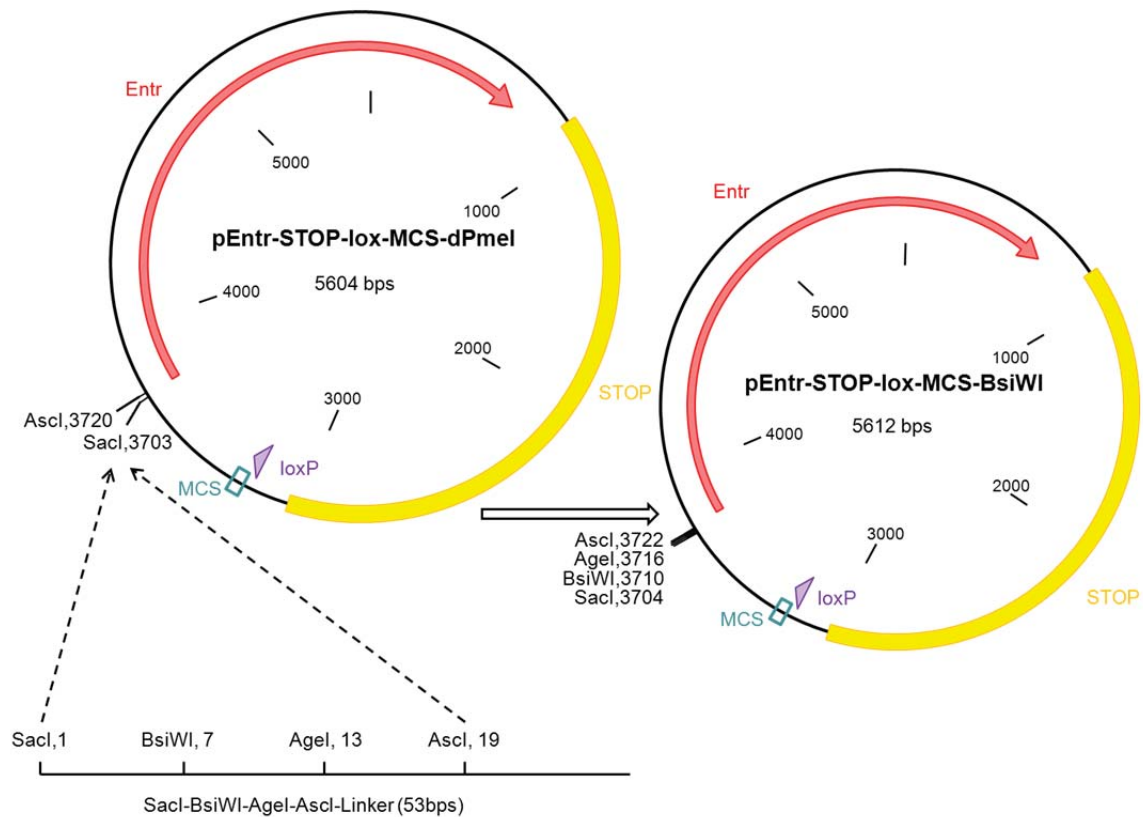
(BstEII/SmaI) zum Austausch der FRT mit der loxP-site.

Im Hinblick auf die noch folgende Elektroporation des Zielvektors in ES-Zellen wurde das Plasmid *blunt end* mit PmeI und SmaI zur Zerstörung der PmeI-Schnittstelle verdaut. Dies ist für eine spätere Linearisierung des Targetingplasmids notwendig, da im späteren Endvektor, der die für die homologe Rekombination notwendigen homologen Arme besitzt, bereits eine PmeI Schnittstelle vorhanden war. Nach erfolgter *blunt end* Religation wurde die Deletion der PmeI-Schnittstelle durch einen Verdau mit PmeI und XhoI und einer Sequenzierung mit dem Primer pGL3-pA-Pause-UP überprüft.



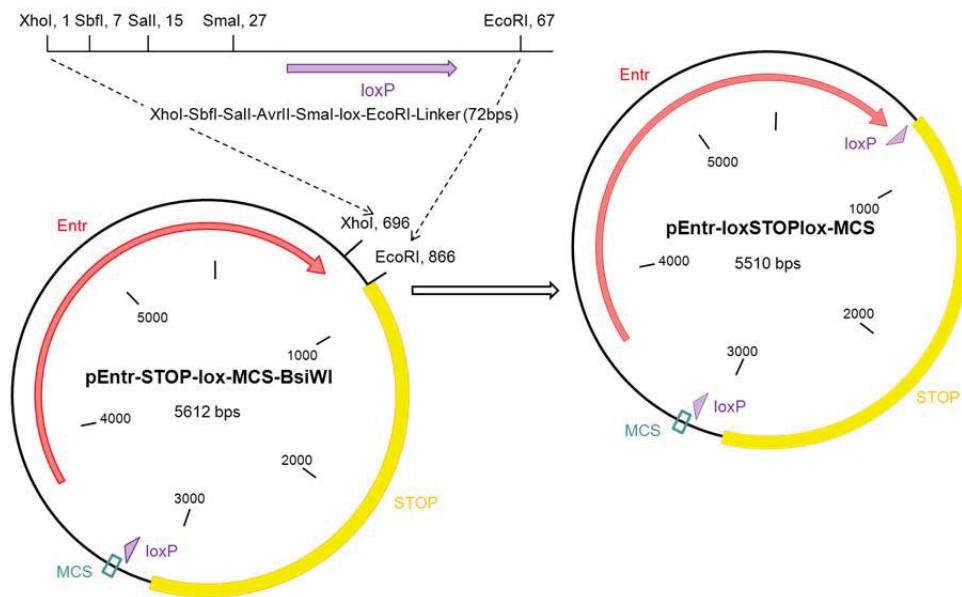
Schritt 2: pEntr-STOP-lox-MCS (PmeI/SmaI) religiert zum Verlust der PmeI-Schnittstelle für spätere Linearisierung des Targetingvektors.  
Der Vektor pEntr-STOP-lox-MCS-dPmeI entsteht.

Mit dem anschließenden Verdau mit SacI und AscI und Dephosphorylierung wurde der Schritt der *sticky end* Ligation des SacI-BsiWI-AgeI-AscI-Linkers 3' der Polyadenylierungsstelle eingeleitet. Dazu wurden die deletierten Basenpaare über Säulchen entfernt, um ein Religieren mit dem Ausgangsplasmid zu verhindern. Der BsiWI-Linker wurde für den letzten Schritt zur Einklonierung in den pDTA-Hprt-Endvektor eingebracht, auch wenn dies, wie im Folgenden geschildert, noch modifiziert werden musste.



**Schritt 3:** Einklonierung der BsiWI-Schnittstelle in pEntr-STOP-lox-MCS-dPmeI (SacI/Ascl) zur späteren Integration in den Endvektor pDTA-Hprt.

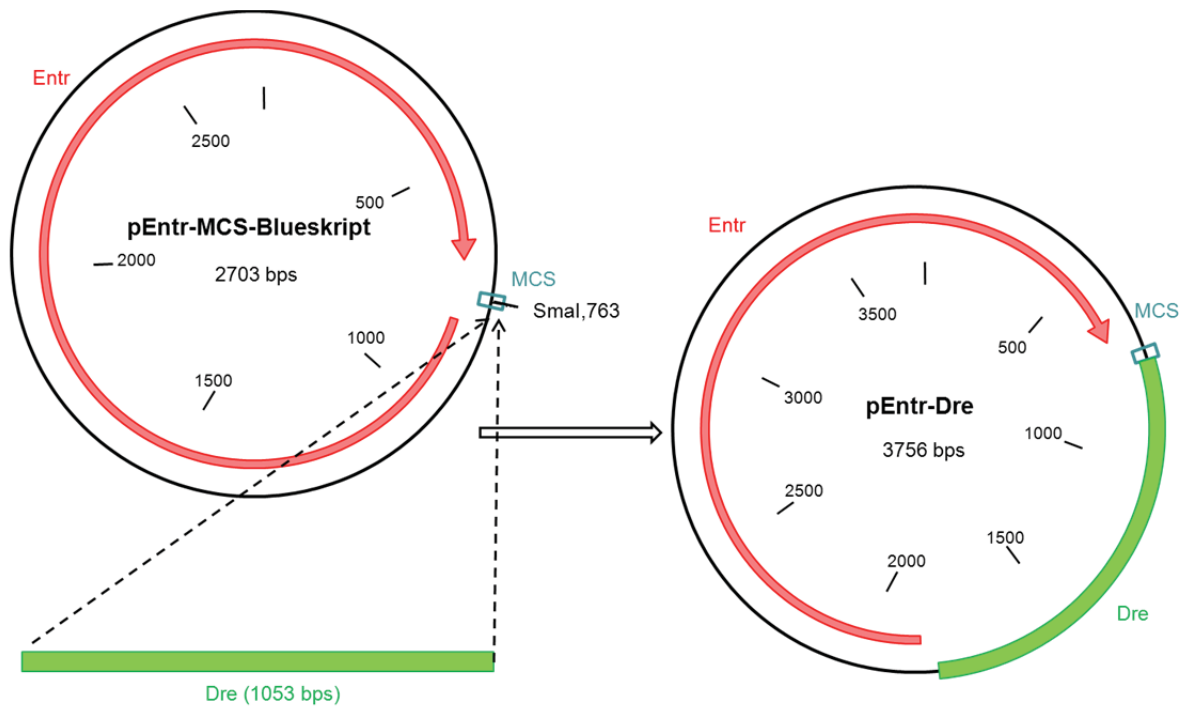
Zur Einfügung der zweiten loxP-Stelle wurde pEntr-STOP-lox-MCS-BsiWI mit XhoI und EcoRI verdaut, dephosphoryliert und über ein Säulchen gereinigt. Der Linker XhoI-SbfI-Sall-AvrII-SmaI-lox-EcoRI wurde *sticky end* ligiert und das dabei entstandene Plasmid pEntr-loxSTOPlox-MCS durch Verdau mit SmaI und Ascl und anschließender Sequenzierung mit dem Primer M13-FP überprüft. Dabei wurde die XhoI-Schnittstelle nicht mehr restauriert. Die Schnittstellen Sall und AvrII im Linker waren zur späteren Eröffnung des Plasmids zur Einklonierung des CAGGS-Promotors notwendig. Die Schnittstelle SbfI ermöglichte am Ende die Einklonierung in den pDTA-Hprt-Endvektor.



**Schritt 4:** Einklonierung des XhoI-SbfI-Sall-AvrII-SmaI-lox-EcoRI-Linkers in pEntr-STOP-lox-MCS-BsiWI (XhoI/EcoRI).

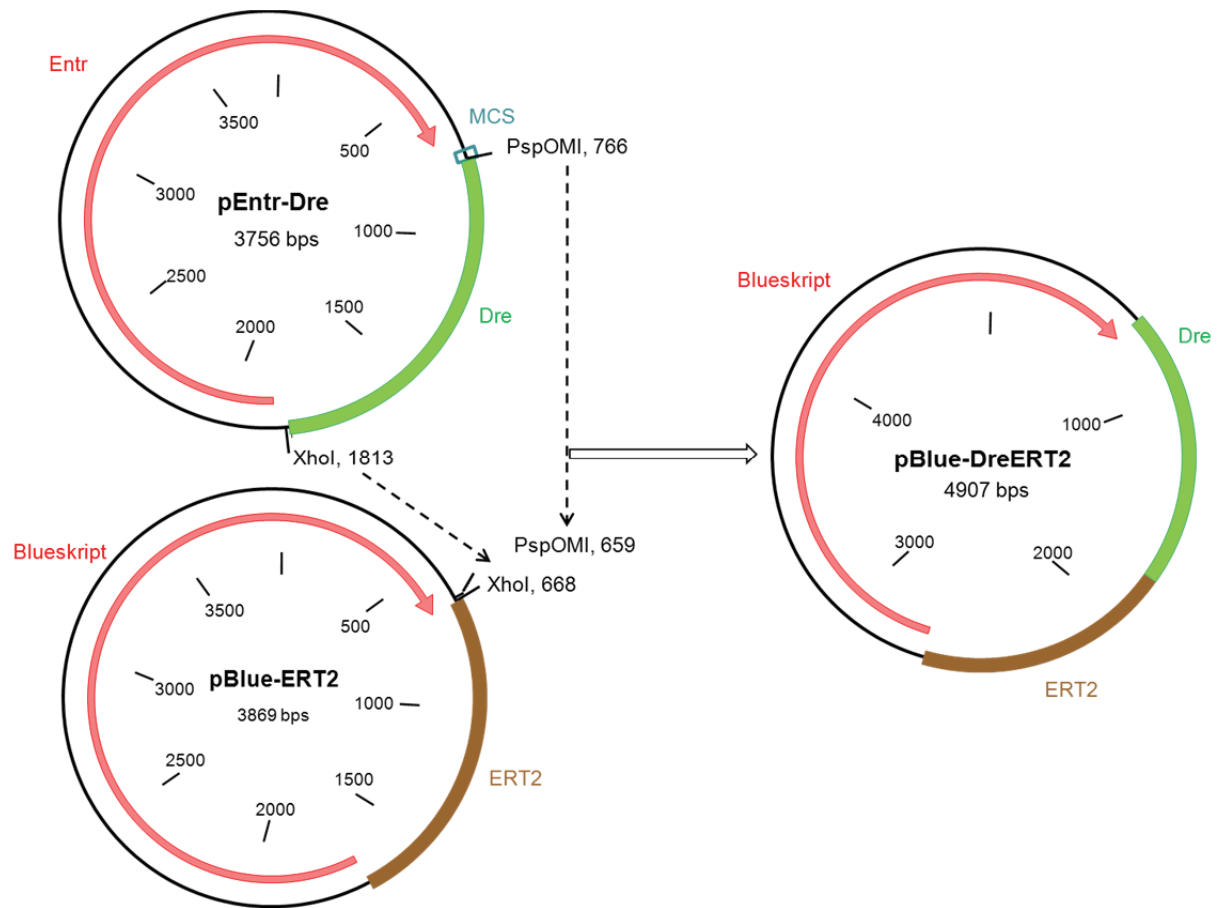
Parallel dazu wurde Dre mittels PCR mit den Primern Dre-UP und -LP amplifiziert, wobei der Vektor pCAGGs-Dre als Matrize diente, und über ein präparatives Gel aufgereinigt. Der kanamycinresistente Klonierungsvektor pEntr-MCS(Blue), der die MCS (*multiple cloning site*) des Blueskriptvektors enthält, wurde mit SmaI *blunt end* verdaut, dephosphoryliert und anschließend mit dem Dre-PCR-Produkt ligiert. Da das pCAGGs-Dre-Plasmid eine Ampicillinresistenz besitzt, wurde die Effizienz der *blunt end* Ligation durch Nutzung des Resistenzwechsels erhöht. Es wurden 48 Klone gepickt und in einem PCR Ansatz mit Primern (Dre-UP und Dre-LP) auf das gewünschte Ligationereignis getestet. Über die Sequenzierung mit den Primern M13-FP und M13-RP wurde das PCR Ergebnis und damit die Einklonierung von Dre bestätigt.





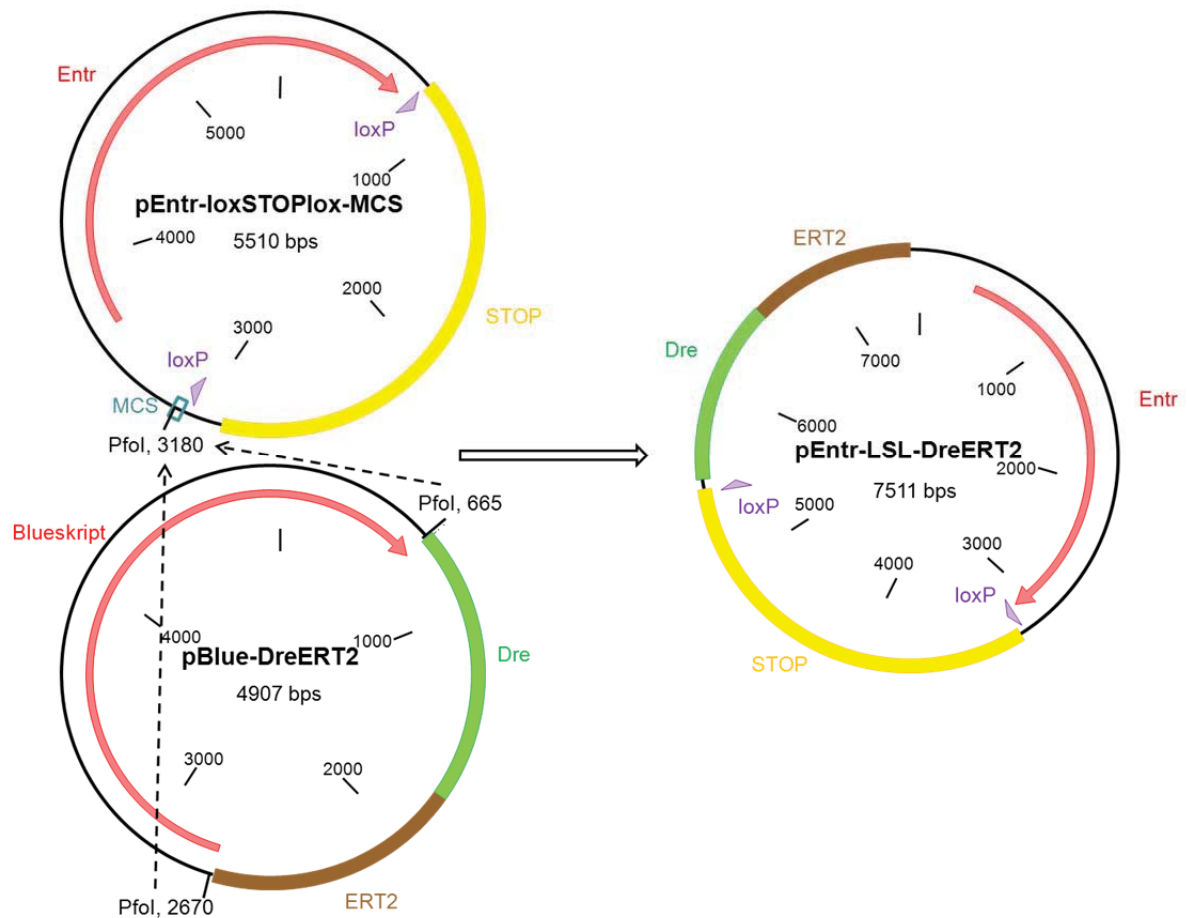
**Schritt 5:** Einklonierung des Dre-PCR-Produkts (amplifiziert am pCAGGs-Dre Plasmid) in pEntr-MCS (Blue) (SmaI).

Zur Isolierung von Dre wurde das Donorplasmid pEntr-Dre mit XhoI und PspOMI verdaut und über ein präparatives Gel mit anschließender Gelelution gereinigt. Das Akzeptorplasmid pBlueskript-ERT2 wurde parallel mit PspOMI und XhoI verdaut, dephosphoryliert und über ein Säulchen gereinigt. Das ampicillinresistente Plasmid lieferte dabei ERT2 für das DreERT2 Fusionsprotein. Das geleluierte Dre wurde *sticky end* 5' der ERT2-Kassette einkloniert zum pBlueskript-DreERT2. Auch in diesem Schritt wurde ein Resistenzwechsel vollzogen. Zur Bestätigung der richtigen Position wurde auch hier wieder auf Testverdau mit PspOMI und XhoI, sowie Sequenzierung mit M13-FP zurückgegriffen.



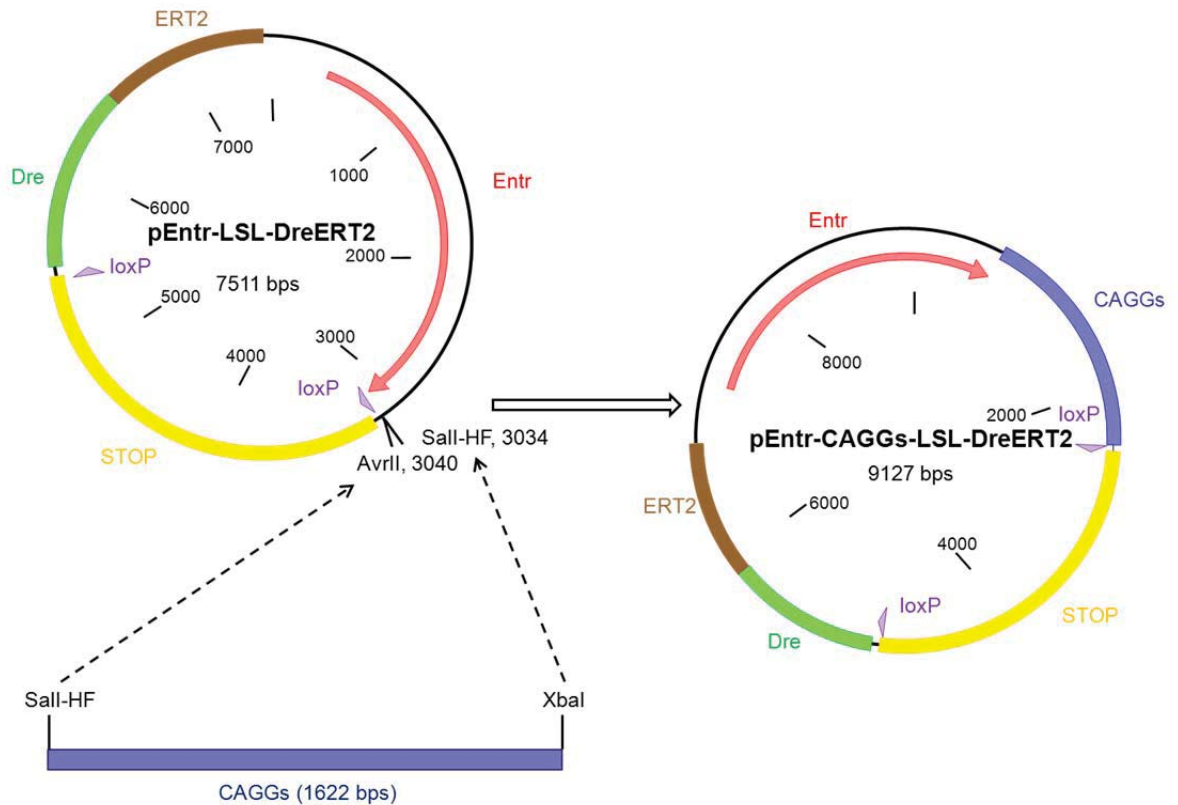
Schritt 6: Einklonierung von Dre aus pEntr-Dre (PspOMI/XhoI) in pBlueskript-ERT2 (PspOMI/XhoI).

Das DreERT2-Element wurde über PfoI-Verdau und ein präparatives Gel mobilisiert. Für die Umklonierung in den kanamycinresistenten Vektor pEntr-loxSTOPlox-MCS, der die loxSTOPlox-Kassette enthält, wurde dieser ebenfalls mit PfoI verdaut und dephosphoryliert. Durch Nutzung des Resistenzwechsels bei der *sticky end* Ligation erfolgte die Einklonierung der geleluierten DreERT2-Kassette im Leseraster (*in frame*) der MCS des PfoI verdauten Akzeptorplasmids und es entstand der Vektor pEntr-loxSTOPlox-DreERT2. Ein Checkverdau erfolgte über SmaI und XhoI und die gerichtete Ligation von DreERT2 wurde mit NdeI-Verdau geprüft.



Schritt 7: Einklonierung von DreERT2 aus pBlueskript-DreERT2 (PfoI) in pEntr-loxSTOPlox-MCS (PfoI).

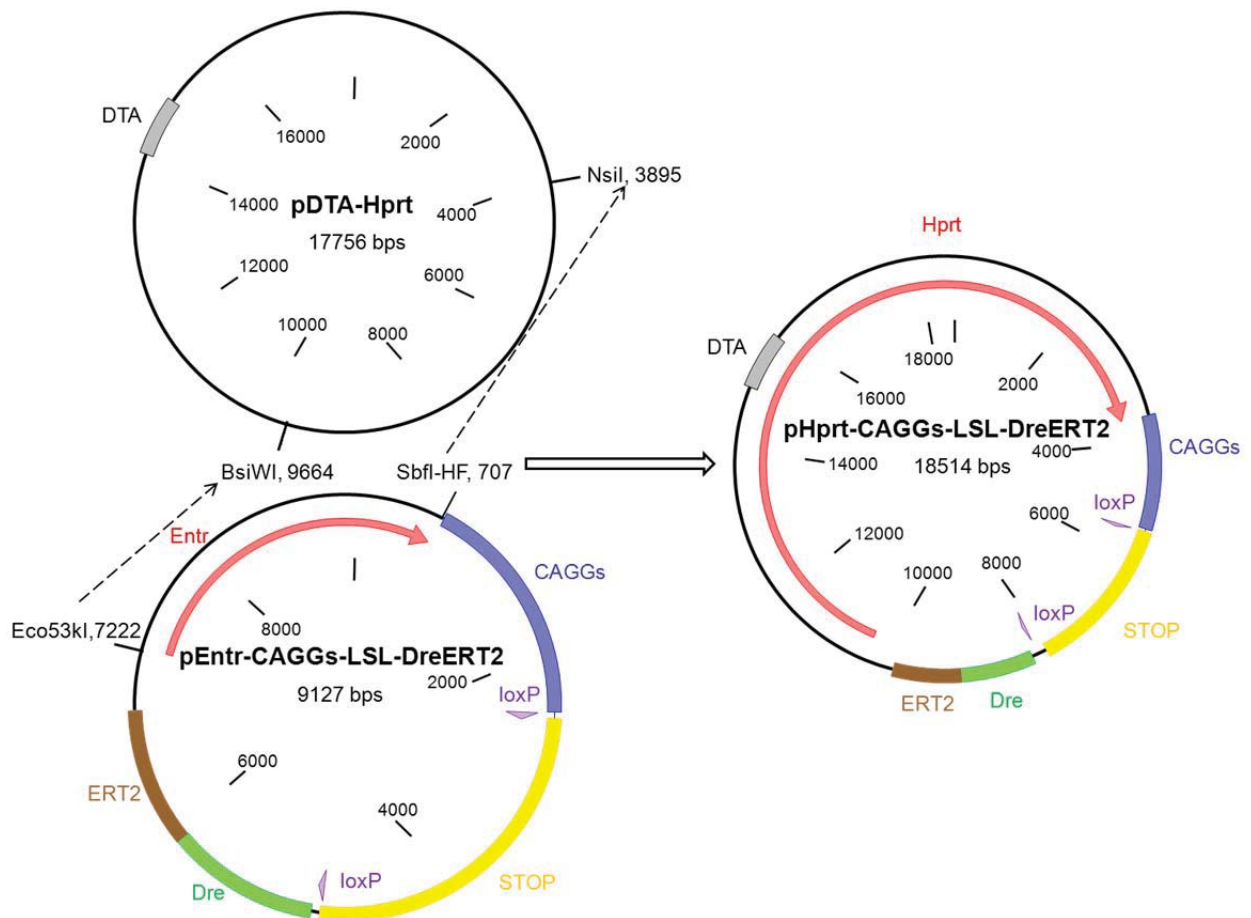
Der letzte Klonierungsschritt bestand in der Einklonierung des CAGGs-Promotors 5' der loxSTOPlox-Kassette. Dazu wurde CAGGs aus dem pCAGGs-Dre Plasmid mit Hilfe von Sall-HF und XbaI mobilisiert und über ein präparatives Gel aufgereinigt. Als Akzeptorplasmid diente pEntr-loxSTOPlox-DreERT2, das ebenfalls mit Sall-HF und AvrII verdaut, dephosphoryliert und über ein Säulchen aufgereinigt wurde. Die *sticky end* Ligation von pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 wurde durch Verdau mit Sall-HF und SmaI wie auch durch Sequenzierung mit FSFneoNcoLP geprüft.



**Schritt 8:** Einklonierung von CAGGs aus pCAGGs-Dre (Sall-HF/XbaI) in pEntr-loxSTOPlox-DreERT2 (Sall-HF/AvrII).

Bei der Herstellung des Targetingvektors stellte sich bei dem Verdau des Plasmids pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 mit BsiWI und SbfI-HF eine zusätzliche, vorher nicht bekannte Schnittstelle heraus. Diese wurde durch Einzelverdaus mit den jeweiligen Enzymen nachgeprüft. Dabei wurde festgestellt, dass es eine zusätzliche BsiWI-Schnittstelle im Bereich von CAGGs gab. Eigentlich sollte eine *sticky end* Ligation in den Targetingvektor pDTA-Hprt erfolgen, da eine gerichtete Ligation *sticky end* häufiger zustande kommt als *blunt end*. Dies war aber durch die zusätzliche Schnittstelle nun nicht möglich und auch im Voraus nicht absehbar, da die zugeschickte Sequenz des CAGGs-Promotors diese Schnittstelle nicht enthielt und eigene Bemühungen einer Sequenzierung durch den GC-Reichtum der Sequenz scheiterten. Somit wurde das Insert CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 aus pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 mit SbfI-HF, einem *sticky end cutter*, und Eco53kI, einem *blunt end cutter*, geschnitten und über ein präparatives Gel isoliert und eluiert. Als Vektor diente das mit BsiWI und NsiI verdaute und dephosphorylierte pDTA-Hprt-Geleluat, das eine Ampicillinresistenz aufweist. Die Ligation erfolgte dabei sowohl mit

einem *sticky*- als auch einem *blunt*-Ende unter Nutzung des Resistenzwechsels und ergab den Targetingvektor pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2. Geprüft wurde dieser durch PCR an gepickten Klonen mit den Primerpaaren Hprt-sc-UP1 und CAG-sc-LP1, sowie BrpA-kurz-sc-UP und Hprt-sc-LP1. Auch ein EcoRV- und XhoI-Verdau und eine Sequenzierung mit den Primern CAG-sc-LP1 und Brpa-UP wurden zur zusätzlichen Kontrolle durchgeführt. Nach dieser Verifizierung des Targetingvektors wurde dieser für die anschließende Elektroporation in ES-Zellen vorbereitet.



Schritt 9: Einklonierung von CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 aus pEntr-loxSTOPlox-DreERT2 (SbfI-HF/Eco53kl) in pDTA-Hprt (BsiWI/NsiI).

Das Endergebnis dieser Klonierung ist das Konstrukt pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 (Abbildung 26), das zur Rekombination des Hprt-Lokus in ES-Zellen verwendet wurde.

Die einzelnen Bestandteile dieses Targetingvektors sind:

- kurzer/ langer Arm: genomische Hprt-Sequenz für die ortskorrekte Integration.
- CAGGs: Promotor zur Expression von DreERT2 nach entfernter STOP-Kassette.
- loxSTOPlox: loxP flankiertes STOP-Element, das die Expression des nachgeschalteten DreERT2-ORFs (*open reading frame*) verhindert. Die STOP-Kassette ist durch die pankreasspezifische Cre-Aktivität während der Embryonalphase entfernbar.
- neo/DTA: positiver bzw. negativer Selektionsmarker zur Selektion homolog rekombinierter ES-Zellen.
- DreERT2: ORF für ein Fusionsprotein aus der Rekombinase Dre und der Ligandenbindedomäne ERT2. Die Aktivität von Dre wird erst nach Tamoxifeninduktion ermöglicht.
- PmeI: Restriktionsschnittstelle zur Linearisierung des Targetingvektors.
- BamHI/HindIII: Restriktionsschnittstellen zur Überprüfung der korrekten Integration mittels Southern Blot.

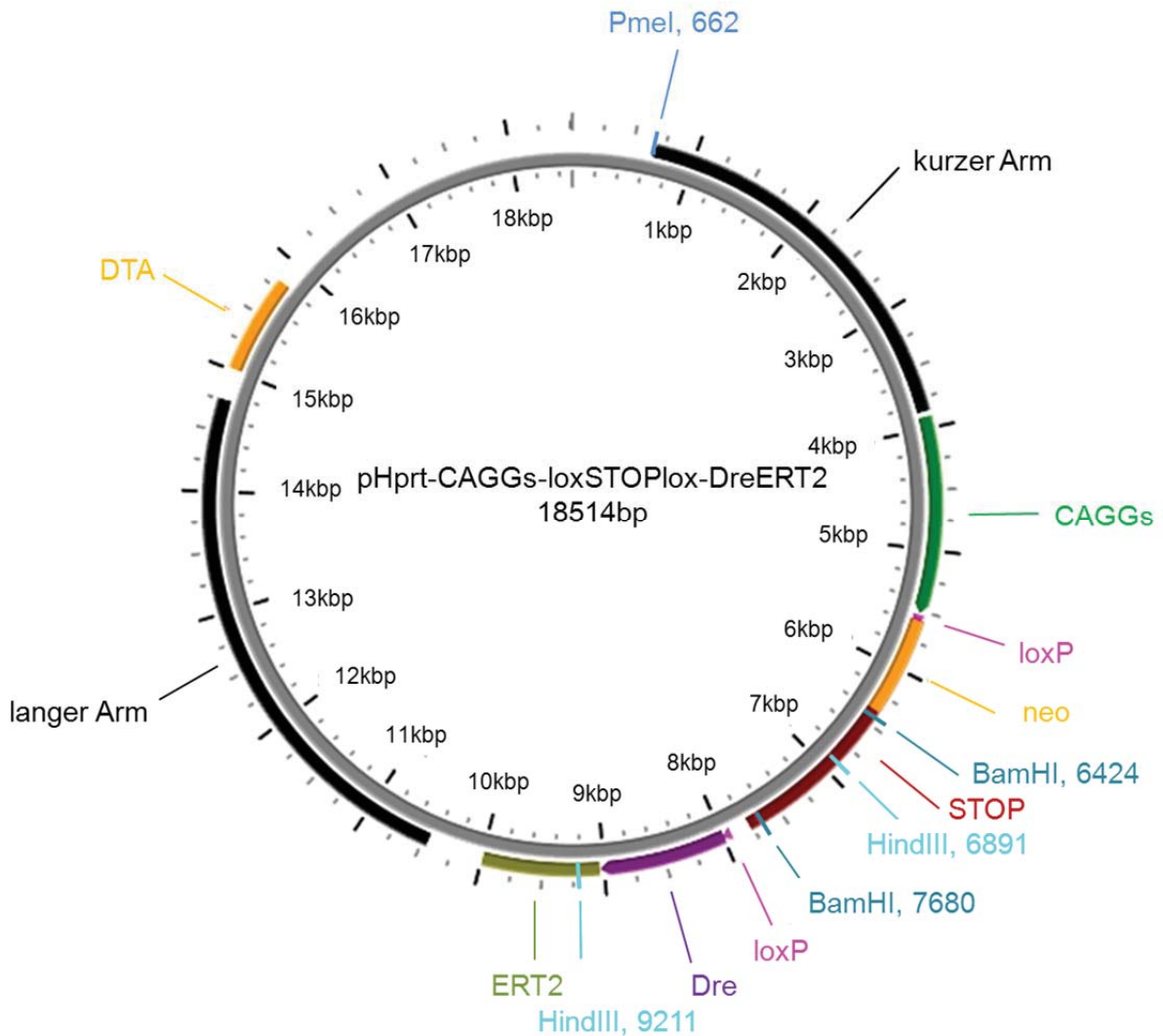


Abbildung 26: Targetingvektor pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 zur homologen Rekombination in den Hprt-Lokus.

## 5.2 Überprüfung der einzelnen Module der Targetingkonstrukte *in vitro*

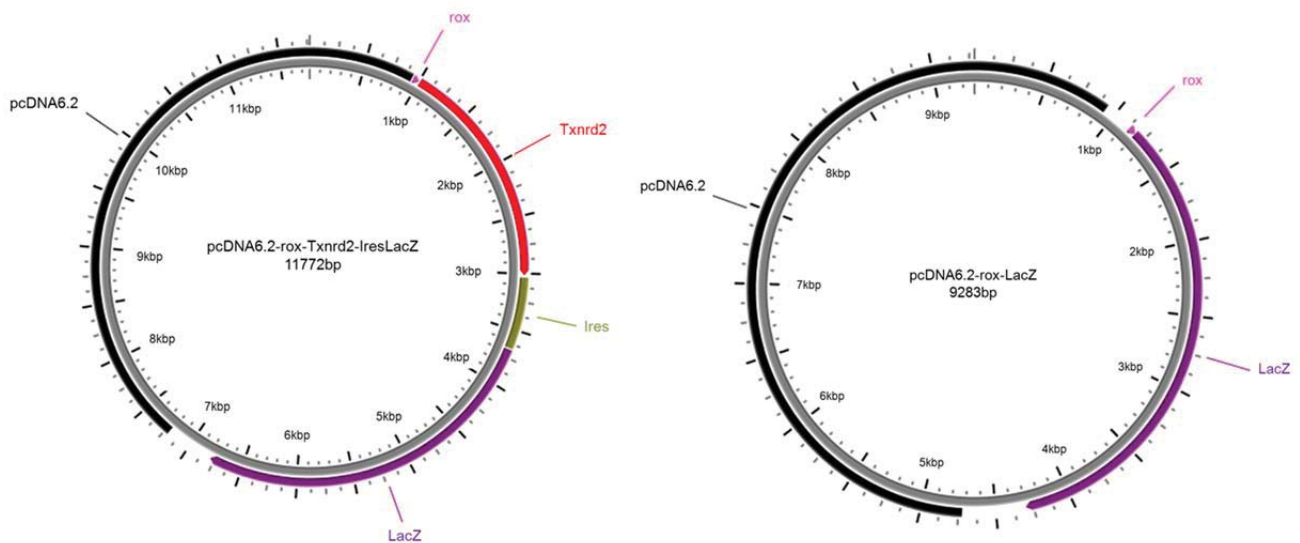
Weil das Vorhaben so komplex ist und die Klonierungen so viele Schritte umfassten, wurden möglichst alle Module auf Funktionalität hin bereits, so fern möglich, *in vitro*, das heißt in Zellkultur, getestet.

### 5.2.1 Reportergen LacZ

Für die *in vitro* Testung des Reportergens LacZ und damit der Expression von *Txnrd2*-IresLacZ, das als ein Transkript durch den endogenen Promotor abgelesen wird, waren weitere Klonierungsschritte unumgänglich. Dafür wurde die STOP-Kassette aus dem Plasmid pEntr-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ enzymatisch entfernt.



Da im Vorfeld die Intensität der Färbung aufgrund des vorgeschalteten *Txnrd2*-Ires, das ebenfalls mit abgelesen wird, noch nicht abschätzbar war und eventuell zu schwach gewesen wäre, wurde für den sicheren Nachweis der  $\beta$ -gal Färbung noch ein Konstrukt erstellt. Bei diesem wurde nicht nur die STOP-Kassette, sondern auch *Txnrd2*-Ires entfernt. Dazu erfolgte ein Verdau von pEntr-roxSTOPprox-*Txnrd2*-IresLacZ mit BstEII und NotI zur Entfernung der STOP-Kassette und mit XmaI und AgeI zur Entfernung von STOP-*Txnrd2*-Ires mit jeweils nachfolgender Religation. Somit entstanden die beiden Konstrukte pEntr-rox-*Txnrd2*-IresLacZ, geprüft durch SmaI-Verdau, und pEntr-rox-LacZ, geprüft durch AflII- und AscI-Verdau. Die Einklonierung in einen pcDNA6.2-Vektor erfolgte durch Klonase Reaktion. Das zu exprimierende Gen wird dabei unter die Kontrolle des Cytomegalo-Virus (CMV)-Promotors, einem stark exprimierenden, prokaryotischen Promotor, gebracht, was ein hohes Expressionsniveau ermöglicht. Das Plasmid pcDNA6.2-rox-*Txnrd2*-IresLacZ wurde mit XbaI-Verdau und pcDNA6.2-rox-LacZ mit SacI-HF-Verdau geprüft (Abbildung 27).

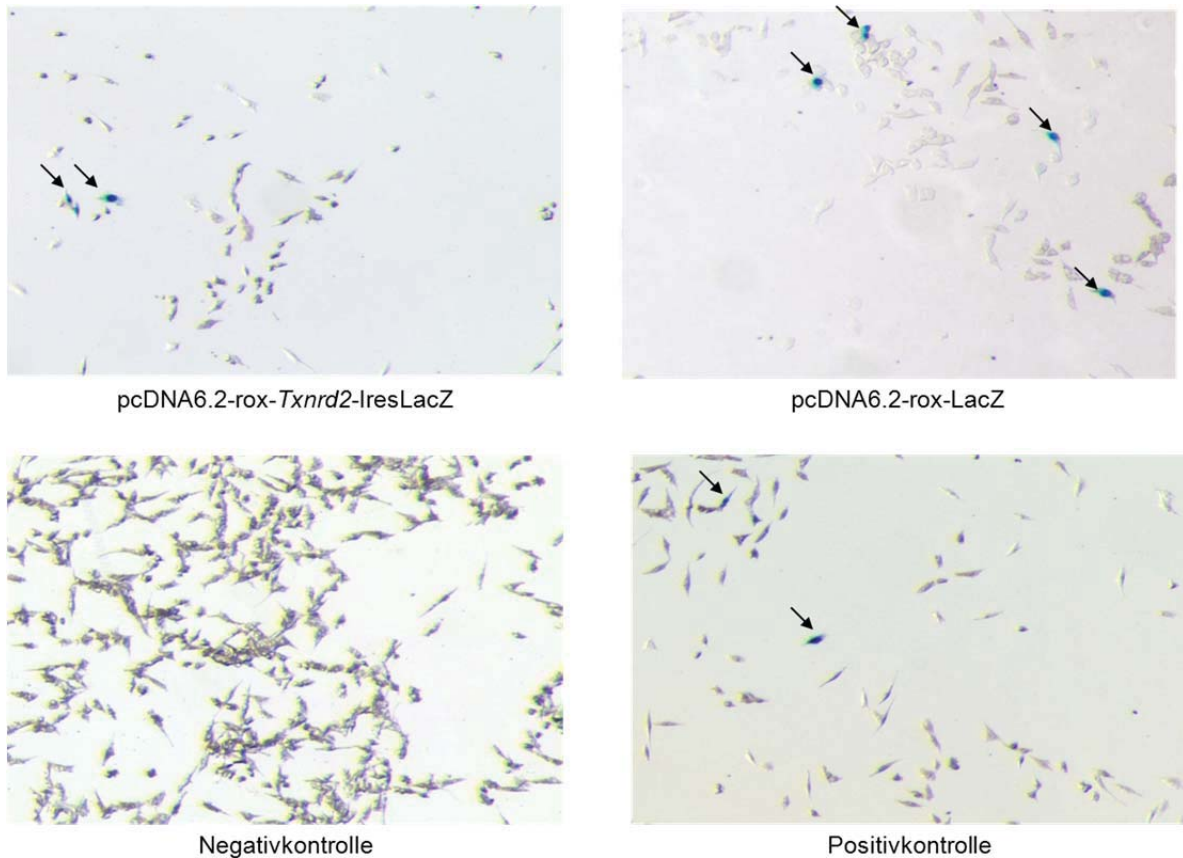


**Abbildung 27: pcDNA6.2-rox-*Txnrd2*-IresLacZ und pcDNA6.2-rox-LacZ zur in vitro Überprüfung der Targetingvektoren.**

Die Plasmide (pcDNA6.2-rox-*Txnrd2*-IresLacZ und pcDNA6.2-rox-LacZ) sowie eine Positiv- (pBroad-LacZ) und Negativkontrolle (pEntr-STOP-lox-MCS) wurden in drei Verdünnungsstufen transient in MIA PaCa2-Zellen transfiziert und die nukleäre Lokalisation der  $\beta$ -Galaktosidase mittels  $\beta$ -gal Färbung verifiziert. Bei den im Doppelansatz mit  $\beta$ -gal gefärbten transient transfizierten Zellen zeigten zwar beide



Proben, wie auch die Positivkontrolle blau gefärbte Zellkerne und damit Expression des LacZ-Proteins, während die Negativkontrolle negativ blieb, jedoch war die Effizienz der Transfektion gemessen an der Anzahl der  $\beta$ -gal gefärbten Zellen an der Gesamtpopulation mit nur etwa 2% niedrig (Abbildung 28).

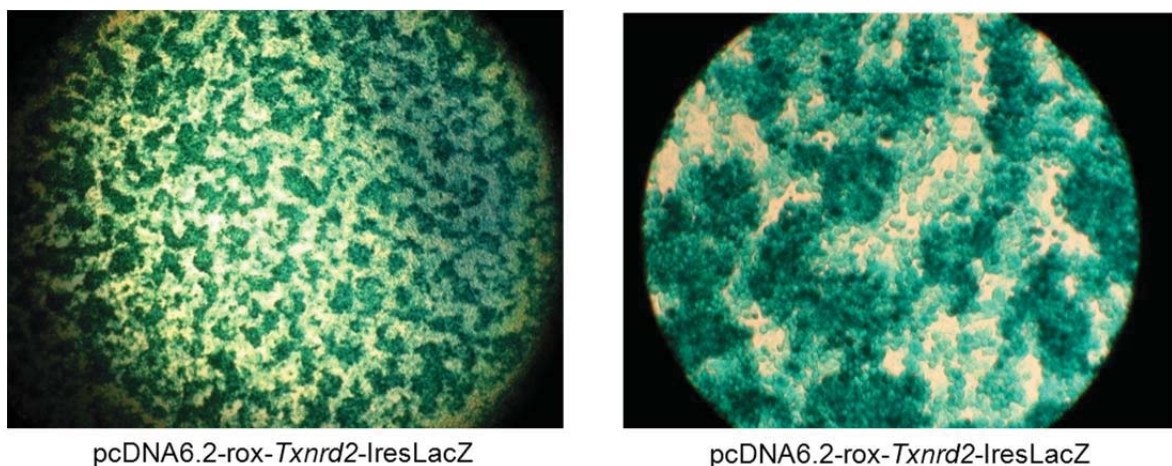


**Abbildung 28:  $\beta$ -gal Färbung der transient transfizierten Plasmide pcDNA6.2-rox-Txnrd2-IresLacZ und pcDNA6.2-rox-LacZ, sowie einer Negativ- und Positivkontrolle.** Sowohl bei den Plasmiden wie auch bei der Positivkontrolle sind  $\beta$ -gal positive Zellkerne (~2%) im Gegensatz zur Negativkontrolle erkennbar.

Auch nach Modifikation von Zellzahl und DNA-Menge gelang es nicht, die Effizienz in der transienten Transfektion zu erhöhen.

Um per Western Blot die Expression der transgenen mitochondrialen Thioredoxin-reduktase im Vergleich zur endogenen Expression der nicht-transfizierten MIA PaCa2-Zelllinie zu bestätigen, wurde eine stabile Zelllinie des Vektors pcDNA6.2-rox-Txnrd2-IresLacZ etabliert. Dies erschien aufgrund der niedrigen transienten Transfektionseffizienz im vorangegangenen Versuch unumgänglich. Zur stabilen Transfektion wurden 1  $\mu$ g des zu transfizierenden Plasmids (pcDNA6.2-rox-Txnrd2-IresLacZ) in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l mit dem Restriktionsenzym Sall-HF

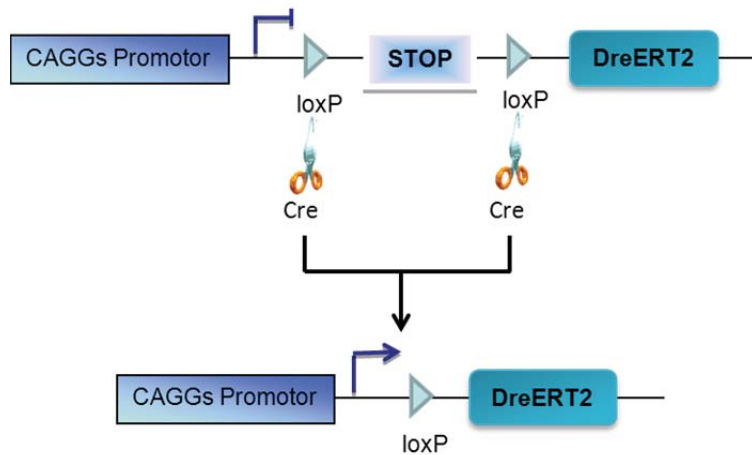
linearisiert. Eine Aufreinigung erfolgte durch ein präparatives Gel mit anschließender Gelelution. Nach Transfektion in MIA PaCa2-Zellen erfolgte am nächsten Tag eine Selektion mit G418-BC, Kulturmedium mit Zusatz von Geneticin (G418-BC) in einer Konzentration von 1mg/ml, für zwei Wochen. Anschließend wurden Einzelkolonien isoliert und kultiviert. Nach  $\beta$ -gal Färbung ergab sich eine Effizienz von etwa 90%. Damit bestätigte sich noch einmal die Funktionalität des LacZ-Proteins (Abbildung 29). Von den stabilen Einzelklonen wurde Protein geerntet und ein Western Blot zur Bestätigung der Expression der transgenen TXNRD2 durchgeführt (vgl. Abschnitt V.2.3.).



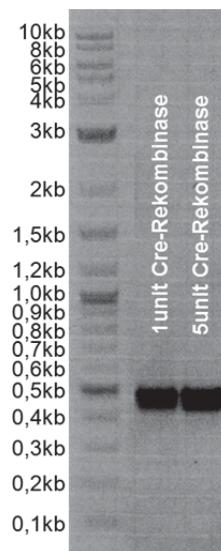
**Abbildung 29:**  $\beta$ -gal Färbung der stabilen Transfektion von pcDNA6.2-rox-*Txnrd2*-lresLacZ. Die Transfektionseffizienz lag bei 90% und bestätigte damit die Wirksamkeit der Expression von *Txnrd2*-lresLacZ.

### 5.2.2 STOP-Kassetten: Rekombination der rox-sites mit Dre, Dichtigkeit und Expression des Zielgens nach Entfernung der STOP-Kassetten

Für die Überprüfung beider STOP-Kassetten war es zuerst wichtig, aus dem Plasmid pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 die STOP-Kassette zu entfernen. Dies wurde in vitro enzymatisch mit Hilfe der Cre-Rekombinase durchgeführt (Abbildung 30, Tabelle 8). So konnte zudem gezeigt werden, dass die Cre-Rekombinase die loxP-sites rekombinieren kann, was durch PCR-Nachweis bestätigt wurde (Abbildung 31, Tabelle 9).



**Abbildung 30:** in vitro Exzision der geflochten STOP-Kassette vor DreERT2 durch Cre-Rekombinase.

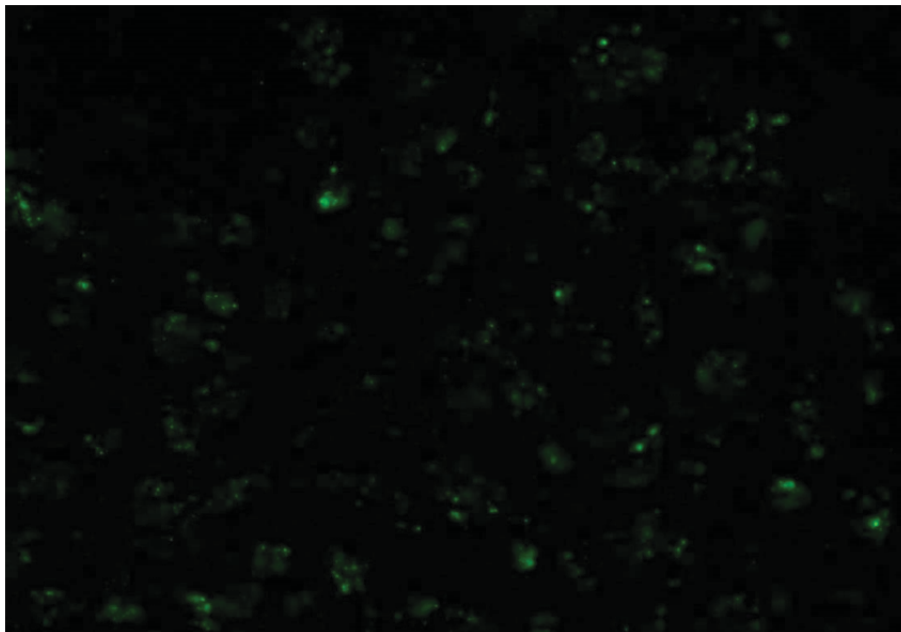


**Abbildung 31:** Nachweis der Exzision der STOP-Kassette und damit der in vitro Rekombination der loxP-sites durch die Cre-Rekombinase mittels PCR (verwendete Primer: CAGGs-sc-UP4, Dre-sc-LP3). Die Entfernung der STOP-Kassette wurde sowohl bei einem Ansatz mit 1unit als auch mit 5unit Cre-Rekombinase bei einer spezifischen Bande von 427bp bestätigt.

Nach Transformation des Cre-Rekombinase Ansatzes in Stbl3 Bakterien durch die KCM-Methode stand das Plasmid pEntr-CAGGs-lox-DreERT2 für die weiteren Zellkulturversuche zur Verfügung. Dieses wurde durch PCR an 24 gepickten Klonen mit dem Primer CAGGs-sc-UP4, Checkverdau mit XbaI und anschließender Sequenzierung mit Dre-sc-LP3 geprüft.

Da sich die Effizienz der transienten Transfektion im vorangegangenen Versuch als sehr gering erwies, wurde auch für den folgenden Versuch eine stabile Zelllinie

etabliert. Dazu wurde eine Klonase Reaktion zwischen pcDNA6.2/EmGFP-Bsd/V5-DEST und pEntr-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ durchgeführt, so dass das Plasmid pcDNA6.2-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ entstand. Dieses wurde durch EcoRV-Verdau auf seine Richtigkeit überprüft. Für die stabile Transfektion in MIA PaCa-2 Zellen wurde das Plasmid linearisiert, um so die Effizienz zu erhöhen. Dafür wurde es mit Sall-HF verdaut und anschließend über ein präparatives Gel und Gelelution aufgereinigt. Nach Transfektion der MIA PaCa-2 Zellen mit pcDNA6.2-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ durch *Effectene* wurde für die Selektion ein Selektivmedium mit DMEM, 10% FKS, 1% P/S und Blasticidin in einer Konzentration von 10µg/ml gegeben. Nach erfolgter Selektion wurden die Klone gepickt und vereinzelt. Dabei bietet der pcDNA6.2-Vektor neben dem stark exprimierenden CMV-Promotor den Vorteil durch ein EmGFP-Fragment die erfolgreiche stabile Transfektion mittels Fluoreszenz nachzuweisen (Abbildung 32).

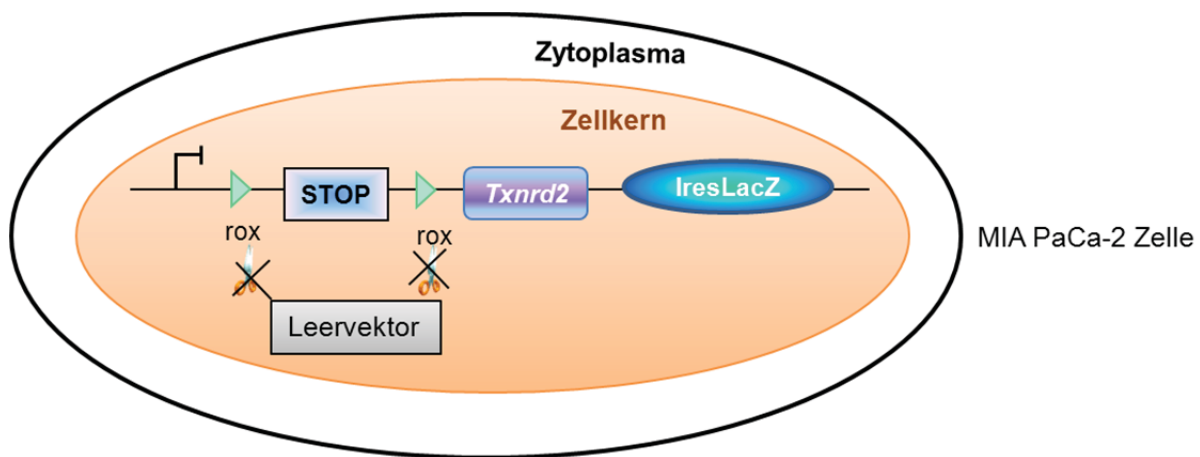


**Abbildung 32:** Bestätigung der Integration von pcDNA6.2-rox-STOProx-*Txnrd2*-IresLacZ in MIA PaCa-2 Zellen per stabiler Transfektion mit EmGFP als zusätzliches Reportersystem.

Die etablierte stabile Zelllinie wurde anschließend in mehreren Doppelansätzen transient cotransfiziert. Dafür wurde mindestens vier Tage vor geplanter transienter Transfektion das Selektivmedium abgesetzt, durch Kulturmedium (DMEM, 10% FKS) ersetzt und nach vier bzw. sechs Tagen die Zellen  $\beta$ -gal gefärbt.

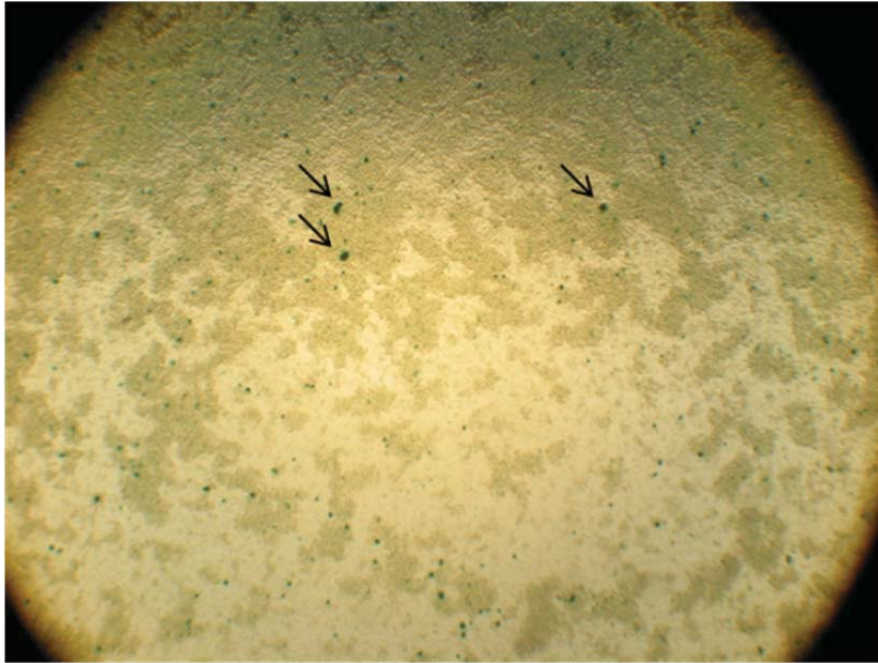
Zum einen wurde die stabile Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ mit einem Leervektor (pEntr-STOP-lox-MCS) zur Überprüfung der roxSTOProx Kassette

transient transfiziert (Abbildung 33; Abbildung 34). Zum anderen erfolgte eine transiente Transfektion mit pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 (Abbildung 35, Abbildung 36) unter Gabe von 4-Hydroxytamoxifen (500nmol) zur Testung der loxSTOPlox-Kassette. In beiden Fällen wurde die Dichtigkeit, also die fehlende Transkription aufgrund einer funktionstüchtigen STOP-Kassette, geprüft. Dabei darf keine Rekombination der *rox-sites* und damit keine Entfernung der STOP-Kassette stattfinden, so dass LacZ nicht exprimiert wird. Die  $\beta$ -gal Färbung blieb bis auf eine geringe Anzahl an blau gefärbten Zellen (~0,2%-0,3%) negativ.

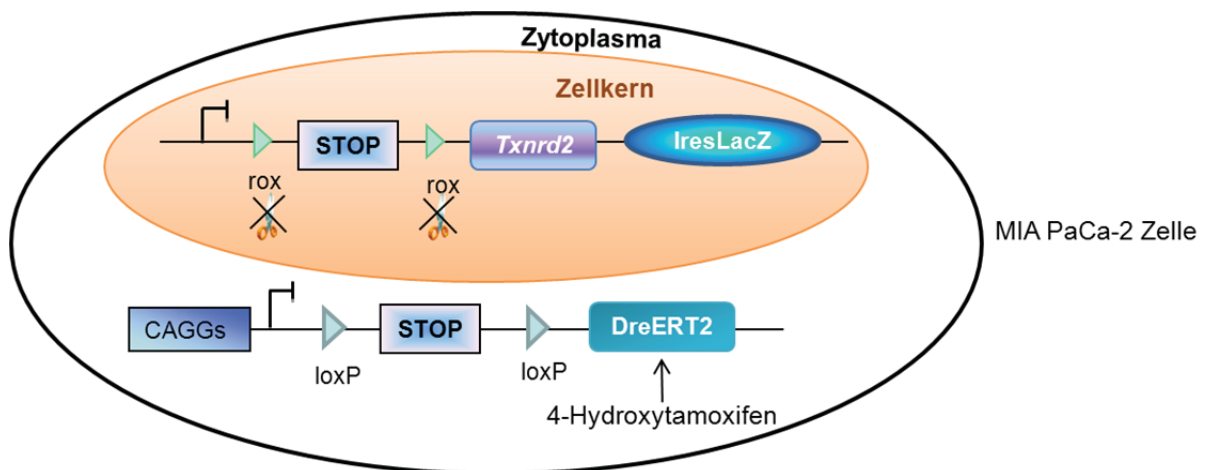


**Abbildung 33: Prüfung der Dichtigkeit der roxSTOPProx-Kassette.** Die stabile Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPProx-Txnrd2-IresLacZ wurde transient mit einem Leervektor transfiziert. Der Leervektor hat keine Rekombinationseffizienz auf die *rox-sites* und damit wird die STOP-Kassette nicht entfernt. Somit bleibt die Expression von LacZ verhindert, weshalb die  $\beta$ -gal Färbung negativ bleibt.

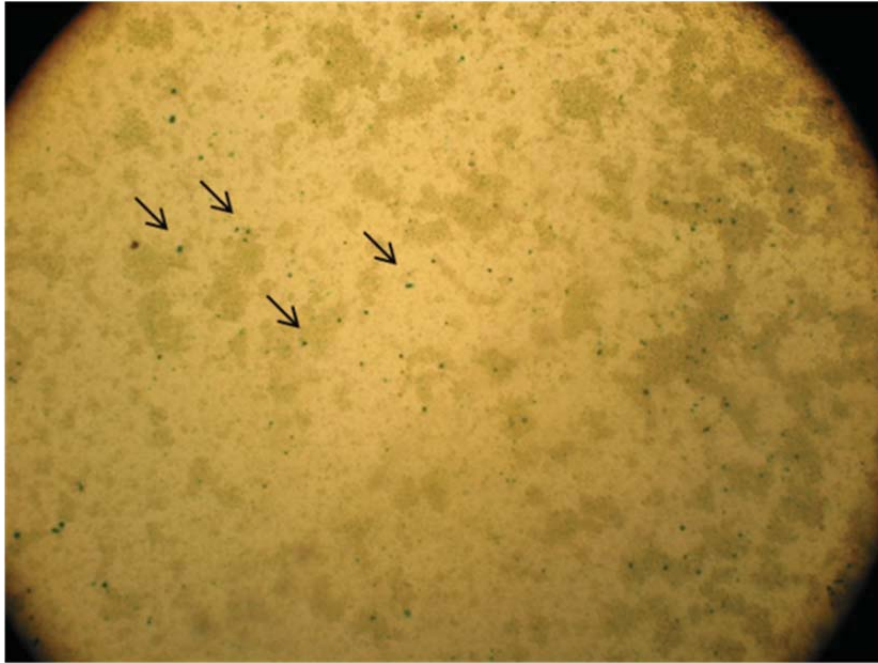




**Abbildung 34: β-gal Färbung der transienten Transfektion der stabilen Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPProx-Txnrd2-IresLacZ mit einem Leervektor.** Aufgrund fehlender Rekombination sind mit Ausnahme weniger Zellen (~0,2%, siehe →) keine β-gal positiven Zellkerne vorhanden. Somit bestätigte sich die Dichtigkeit der roxSTOPProx-Kassette.

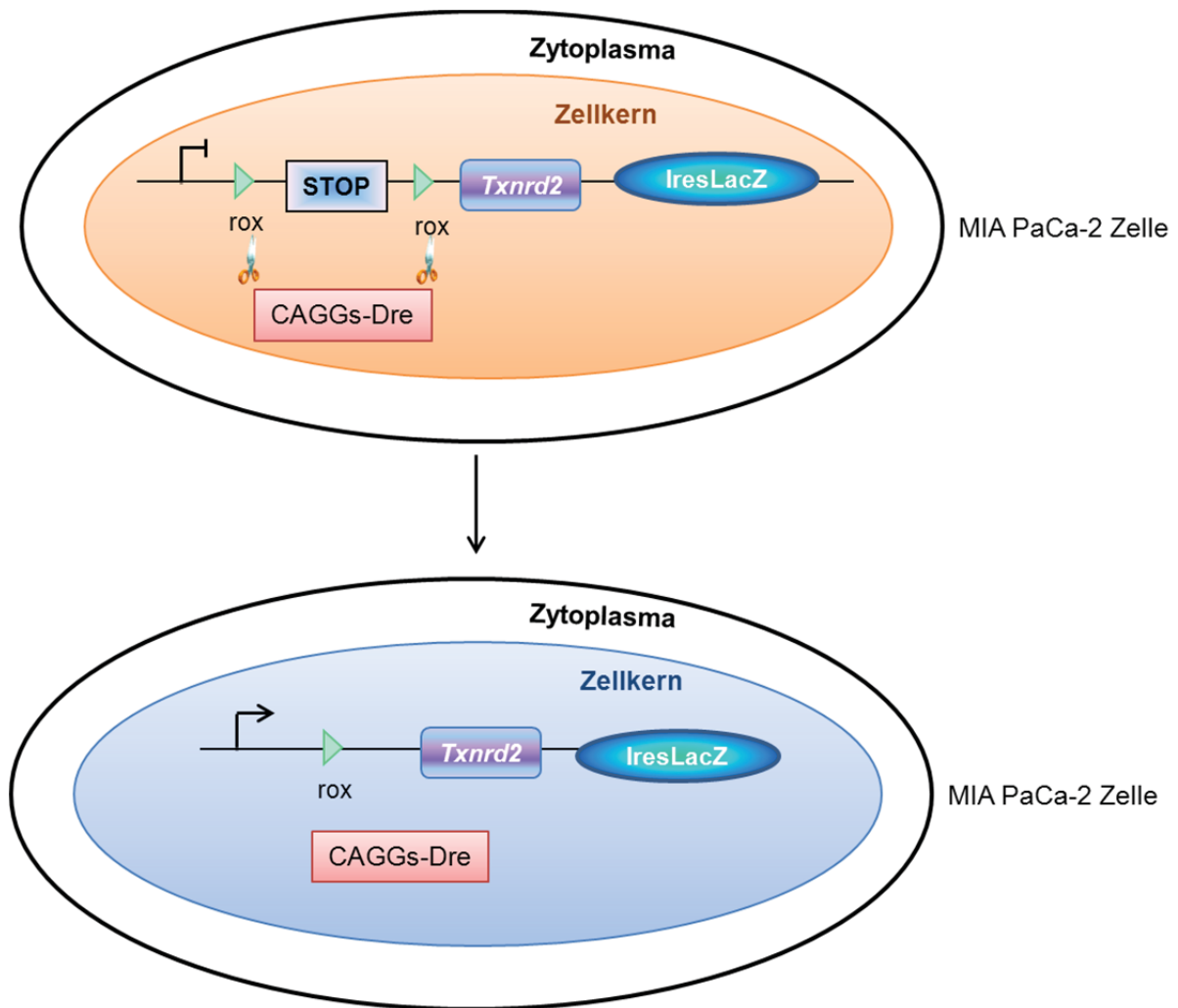


**Abbildung 35: Prüfung der Dichtigkeit der loxSTOPlox-Kassette.** Die stabile Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPProx-Txnrd2-IresLacZ wurde transient mit dem Plasmid pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 transfiziert. Das Plasmid erzeugt aufgrund der ausgestoppten Dre-Kassette keine Dre-Expression und damit keine Rekombinationseffizienz auf die rox-sites. Die STOP-Kassette wurde deshalb nicht entfernt. Die Expression von LacZ wird verhindert, wodurch die β-gal Färbung negativ bleibt.



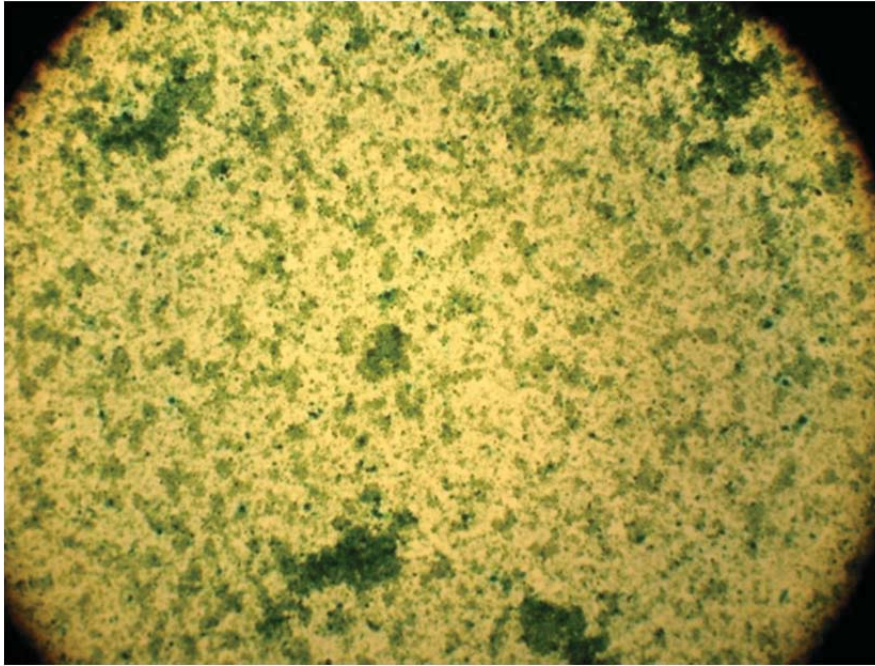
**Abbildung 36:**  $\beta$ -gal Färbung der transienten Transfektion der stabilen Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPprox-Txnrd2-IresLacZ mit dem Plasmid pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2. Aufgrund fehlender Rekombination sind mit Ausnahme weniger Zellen ( $\sim 0,3\%$ , siehe  $\rightarrow$ ) keine  $\beta$ -gal positiven Zellkerne vorhanden. Somit bestätigte sich die Dichtigkeit der loxSTOPlox-Kassette.

Die Rekombinationseffizienz von Dre wurde mittels transients Transfektion des Plasmids CAGGs-Dre (Abbildung 37; Abbildung 38) geprüft. Zusätzlich wurde die Wirksamkeit von DreERT2 durch transiente Transfektion des Plasmids pEntr-CAGGs-lox-DreERT2 nachgewiesen (Abbildung 39, Abbildung 40). Für die Induktion von Dre wurde dem Kulturmedium einen Tag nach der transienten Transfektion bis zur anschließenden Färbung 4-Hydroxytamoxifen in einer Konzentration von 500nmol zugesetzt. In beiden Fällen wird durch Rekombination der roxSTOPprox-Kassette die *Txnrd2-IresLacZ* Expression ermöglicht, was durch eine  $\beta$ -gal Färbung bestätigt wurde. Bei CAGGs-Dre konnte dabei eine hohe Rekombinationseffizienz auf die rox-sites mit  $\sim 90\%$  gefärbter Zellkerne nachgewiesen werden. Auch pEntr-CAGGs-lox-DreERT2 wies nach 4-Hydroxytamoxifengabe eine häufige Rekombination ( $\sim 80\%$ ) auf. Somit wurde gezeigt, dass durch Zugabe und Bindung von 4-Hydroxytamoxifen an die Steroidbindedomäne ERT2 des generierten Fusionsproteins DreERT2 Dre aktiviert und in den Zellkern entlassen wird, wo Dre die rox-sites rekombiniert und die STOP-Kassette vor *Txnrd2-IresLacZ* entfernt.

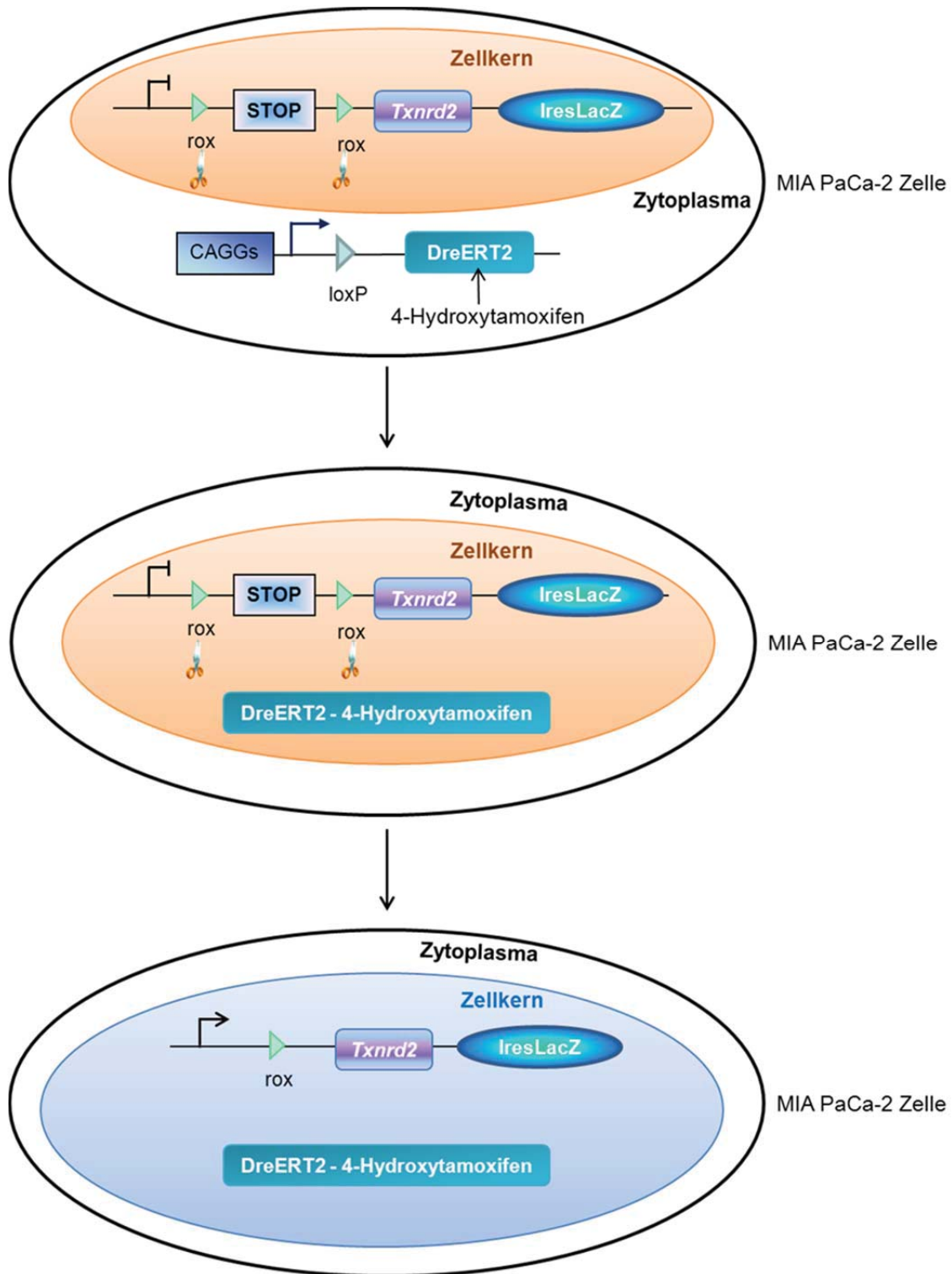


**Abbildung 37: Prüfung der Rekombinationseffizienz von Dre.** Die stabile Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPprox-Txnrd2-IresLacZ wurde transient mit dem Plasmid CAGGs-Dre transfiziert. Dre rekombiniert dabei die rox-sites und entfernt die STOP-Kassette vor Txnrd2-IresLacZ. Die Expression von LacZ wird durch blau gefärbte Zellkerne nach  $\beta$ -gal Färbung bestätigt.

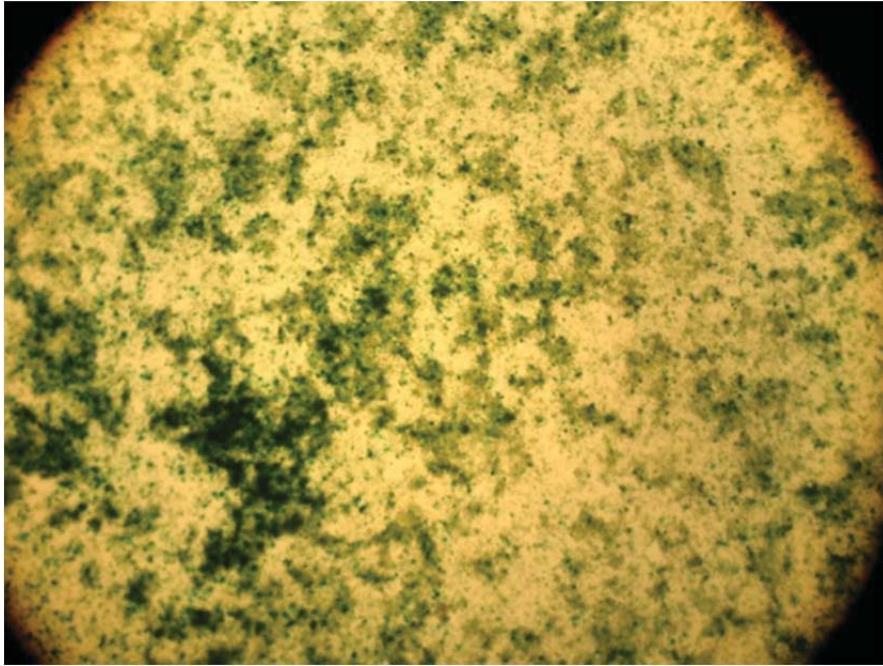




**Abbildung 38:  $\beta$ -gal Färbung der transienten Transfektion der stabilen Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPprox-*Txnrd2*-lresLacZ mit dem Plasmid CAGGs-Dre.** Durch Rekombination der rox-sites durch Dre kommt es aufgrund der entfernten STOP-Kassette zur Expression von *Txnrd2*-lresLacZ. Eine Rekombinationseffizienz von ~90% konnte durch  $\beta$ -gal Färbung bestätigt werden.



**Abbildung 39: Prüfung der Rekombinationseffizienz von DreERT2.** Die stabile Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPprox-Txnrd2-IresLacZ wurde transient mit dem Plasmid pEntr-CAGGs-lox-DreERT2 unter Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen transfiziert. Dre gelangt durch Bindung von 4-Hydroxytamoxifen an dessen Steroidbindedomäne in den Zellkern und rekombiniert die roxSTOPprox-Kassette. Mit der  $\beta$ -gal Färbung konnte die Expression der IresLacZ-Kassette nachgewiesen werden.



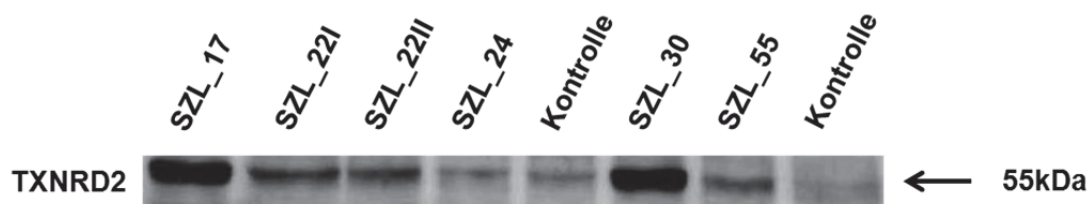
**Abbildung 40:**  $\beta$ -gal Färbung der transienten Transfektion der stabilen Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOProx-*Txnrd2*-lresLacZ mit dem Plasmid pEntr-CAGGs-lox-DreERT2. Nach 4-Hydroxytamoxifenbindung an die Steroidbindedomäne ERT2 gelangte Dre in den Zellkern. Dre rekombinierte dort die rox-sites, so dass es zur Expression von *Txnrd2*-lresLacZ (~80%) kam.

### 5.2.3 *Txnrd2*-ORF und SECIS-Element

Die Transkription von *Txnrd2*-lresLacZ erfolgt zwar als Einheit, die Translation jedoch eigenständig. Somit ist das Reporterprotein LacZ ein einzelnes Protein, das in einer eigenständigen Proteinexpression durch Anlagerung des RNA-Fusionstranskripts an die Ribosomen an der Ires-Sequenz translatiert wird. Damit ist es notwendig die Translation von *Txnrd2* und damit das Vorhandensein des Proteins in einem Western Blot zusätzlich nachzuweisen.

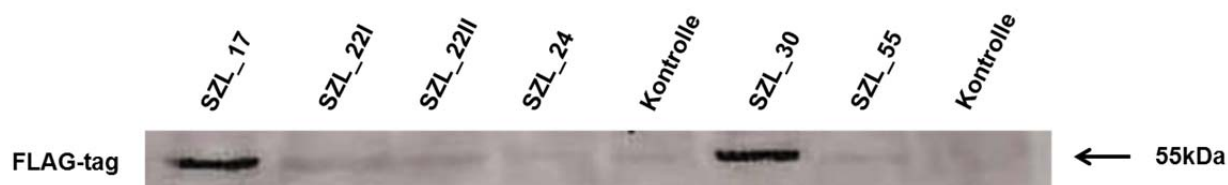
Zur Bestätigung der Proteinexpression der mitochondrialen Thioredoxinreduktase wurde ein Western Blot mit stabil transfizierten Zelllinien (SZL) von pcDNA6.2-rox-*Txnrd2*-lresLacZ durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte MIA PaCa-2 Zellen verwendet. So konnte aufgrund des unterschiedlichen Expressionsniveaus auch die endogene von der transgenen TXNRD2-Expression unterschieden werden. Für den Western Blot wurde anti-TR2 „1C4“ als primärer Antikörper (Inkubation 1:50 in 5% MP-TBST bei 4°C über Nacht) und Anti-rat IgG als sekundärer Antikörper (Inkubation 1:10.000 in 5% MP-TBST bei RT für eine Stunde) verwendet. Es zeigte sich bei allen stabilen Zelllinien eine Überexpression von TXNRD2 im Gegensatz zur Kontrolle (Abbildung 41). Sehr deutlich war diese

Überexpression vor allem bei den Klonen SZL\_17 und SZL\_30 zu erkennen. Die Kontrolle zeigte aufgrund des in MIA PaCa-2 Zellen endogenen *Txnrd2* ebenfalls ein schwaches Signal.



**Abbildung 41: Western Blot zur Bestätigung der Überexpression von Txnrd2.** Stabil transfizierte Zelllinien (SZL) von pcDNA6.2-rox-*Txnrd2*-IresLacZ zeigten eine Überexpression von TXNRD2 im Vergleich zur endogenen Proteinexpression der untransfizierten MIA PaCa-2 Kontrolle.

Um die transgene von der endogenen *Txnrd2*-Expression unterscheiden zu können, befinden sich im ORF der *Txnrd2* FLAG- und Strep-Tags. Tags sind mit dem Zielprotein fusionierte Peptide, Domänen oder Proteine (Terpe, 2003). Der Tag kann zur Detektion eines Proteins im Western Blot eingesetzt werden. Hier wurde die transgene Expression von *Txnrd2* in den stabilen Klonen über den FLAG-Tag bestätigt. Der FLAG-Tag hat eine Größe von 1,01kDa und besteht aus der Aminosäureabfolge DYKDDDDK, wobei die kurze Sequenz des Tags nicht mit der Funktion des Fusionsproteins interferiert. Zum Nachweis des N-terminal liegenden FLAG-Tags wurde der Western Blot für den Überexpressionsnachweis von TXNRD2 noch einmal nach Strippen und Blocken verwendet. Als primärer Antikörper wurde anti-FLAG (1:1.000 in 5% MP-TBST bei 4°C über Nacht) und als sekundärer Antikörper ECL Anti-mouse IgG (1:10.000 in 5% MP-TBST bei RT für eine Stunde) verwendet. Auch hier ergab sich ein deutliches Signal mit der erwarteten Molekülmasse von 55kDa bei den Klonen SZL\_17 und SZL\_30 (Abbildung 42). In den Kontrollen ist kein Signal zu sehen, da diese nur endogene TXNRD2 ohne Tag exprimieren.



**Abbildung 42: Western Blot zur Bestätigung der Expression des FLAG-tags.** Die Expression des FLAG-tags der SZL\_17 und SLZ\_30 bestätigt die Einklonierung von *Txnrd2*.



Damit wurde mittels Western Blot nicht nur die Einklonierung, sondern auch die korrekte Proteinexpression der mitochondrialen Thioredoxinreduktase bestätigt.

### **5.3 Etablierung von Screening-Strategien**

Für die Testung der ES-Zellen auf korrekte Rekombination des Targetingvektors waren Screening-PCRs zu etablieren.

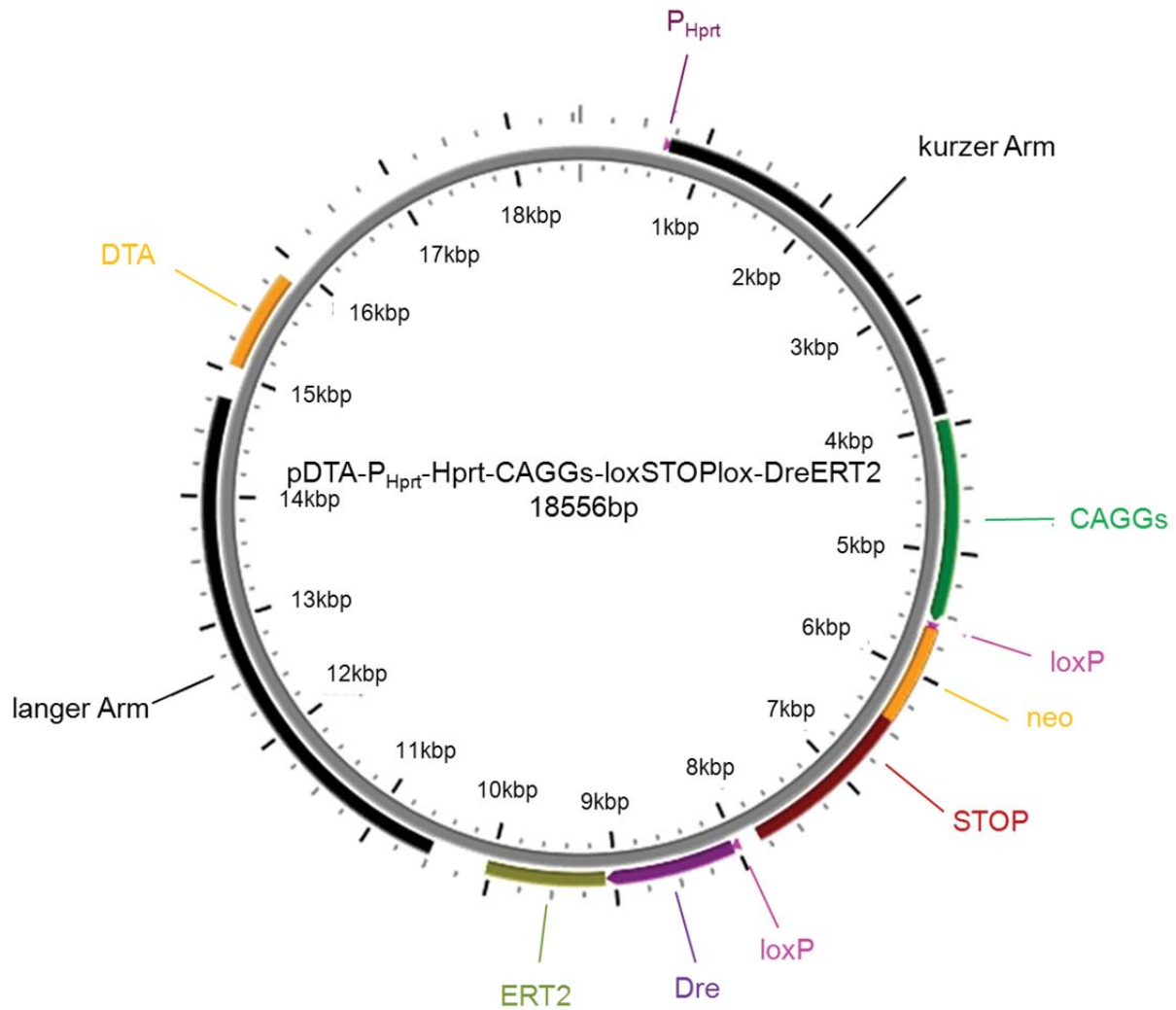
#### **5.3.1 Prüfung der Wirksamkeit der ROSA26 ES Screen-PCR**

Die Prüfung der PCR für ES-Zellklone der ROSA26-Linie wurde mit der Zelllinie P141PPT2 durchgeführt. Diese Zelllinie stammt aus dem Pankreaskarzinom einer Maus mit dem Genotyp  $p48\text{-Cre}^{+/-}$ ,  $LSL\text{-Kras}^{+/-}$ ,  $LSL\text{-Snail}^{+/-}$ ,  $LSL\text{-Tva}^{+/-}$ . Da auch hier der ROSA26-Lokus durch Einfügen einer Kasette mit identischen homologen Bereichen genetisch manipuliert wurde, konnte diese zur funktionalen Prüfung der PCR herangezogen werden. Durch eine Gradienten-PCR wurde der optimale Temperaturbereich von verschiedenen Primerpaaren mit der HotStarTaq Polymerase (Fa. Qiagen) ermittelt. Dabei zeigte sich in allen Temperaturstufen, wie auch bei allen Primerpaaren eine spezifische Bande. Nach mehreren Versuchen zur Ermittlung der optimalen Temperatur, fiel der Entschluss für die spätere Screen-PCR die Primer ROS-ES-LP1 und ROS-ES-UP1 mit einer Annealingtemperatur von 62°C zu verwenden, da dabei die besten Ergebnisse zustande kamen.

#### **5.3.2 Planung der Primerbindungsstelle in pDTA-Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 zur Evaluierung des ES-Zellscreens für den Hprt-Lokus**

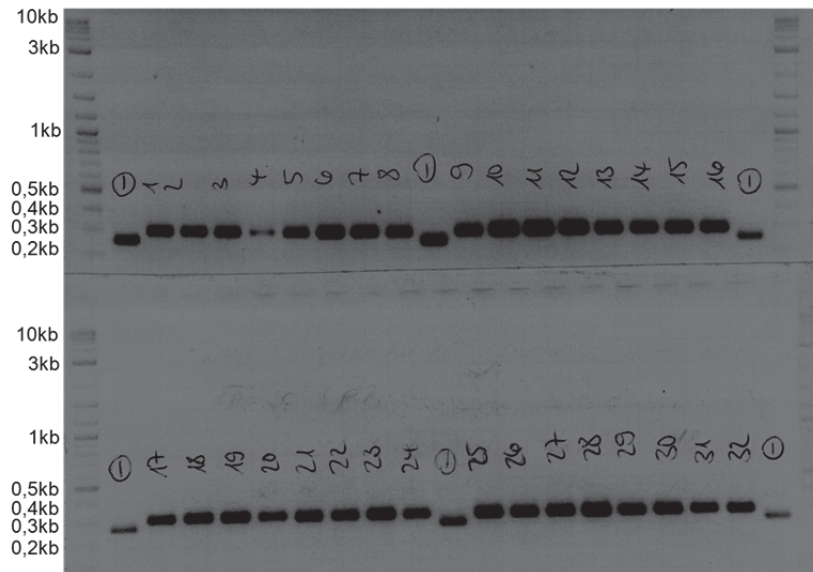
5' des kurzen Arms von pDTA-Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 wurde eine Primerbindungsstelle  $P_{\text{Hprt}}$  in die *Ascl* Schnittstelle einkloniert, die der genomischen Sequenz des murinen Hprt-Lokus vor dem kurzen homologen Bereich entspricht (Abbildung 43). Dadurch konnte in der späteren ES Screen-PCR der Hprt-Lokus detektiert werden.

Dazu wurde der Vektor pDTA-Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 mit *Ascl* verdaut und dephosphoryliert. Der Linker *Ascl*-*NcoI*- $P_{\text{Hprt}}$  wurde in die *Ascl*-Schnittstelle des kurzen homologen Hprt-Arms *sticky end* eingefügt, wodurch diese zerstört wurde.



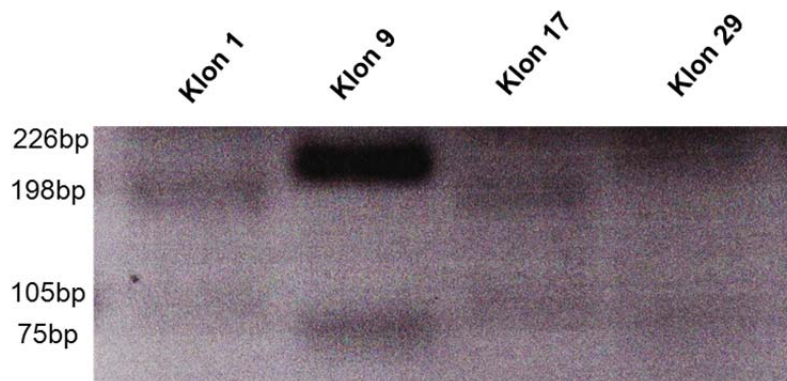
**Abbildung 43: Einklonierung der Primerbindungsstelle P<sub>Hprt</sub> 5' des kurzen homologen Arms des Hprt-Endvektors.** Diese entspricht der genomischen DNA des Hprt-Lokus zur Testung der späteren ES Screen-PCR.

Das erfolgreiche Einklonieren der Primerbindungsstelle P<sub>Hprt</sub> in die dadurch zerstörte AclI-Schnittstelle im kurzen homologen Arm wurde durch PCR an 32 gepickten Klonen bestätigt (Abbildung 44). Dazu wurde das selbst erstellte Primerpaar DTA-sc-UP2 und Hprt-sc-LP2 verwendet, das so entworfen wurde, dass es ~100bp vor bzw. ~400bp nach der Primerbindungsstelle bindet.



**Abbildung 44: Bestätigung der Einklonierung der Primerbindungsstelle  $P_{Hprt}$  in den kurzen Arm des Plasmids pDTA- $P_{Hprt}$ -Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2.** Ohne einklonierte Bindungsstelle ergab sich eine Bande von 258bp und bei erfolgreicher Einklonierung von 302bp. Von 32 gepickten Klonen zeigten alle eine Einklonierung der Primerbindungsstelle durch eine spezifische Bande von 302bp. Als Negativkontrolle (-) wurde das Plasmid pDTA-Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 verwendet.

Ebenfalls erfolgte eine Überprüfung der gerichteten Ligation durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym NcoI des PCR-Produkts (Abbildung 45).



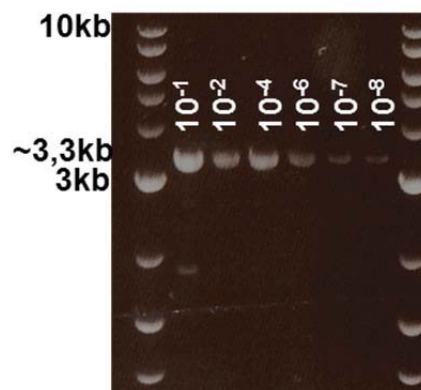
**Abbildung 45: Bestätigung der gerichteten Ligation der Primerbindungsstelle in den kurzen Arm von Hprt.** Bei gerichteter Ligation ergaben sich Banden bei 226bp und 75bp (siehe Klon 9 und Klon 29) und bei ungerichteter Einklonierung bei 198bp und 105bp (siehe Klon 1 und Klon 17).

Auch dieses Ergebnis wurde durch Sequenzierung (DTA-sc-UP2 und Hprt-sc-LP2) bestätigt.

Zur Etablierung der Screen-PCR der Hprt-Klone wurden Primerpaare entworfen und durch eine Gradienten-PCR die optimalen Temperaturbedingungen ermittelt. Es zeigte sich ab einer Temperatur von 68,9°C eine spezifische Bande, die am deutlichsten mit dem Primerpaar Hprt-ES-sc-UP1 und CAG-sc-LP3 war.

Um die Bedingungen der Zellkultur nachzustellen, wurde das Plasmid pDTA-P<sub>Hprt</sub>-Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 auf  $3 \times 10^8$  Kopien pro ml mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Dies entspricht der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ . Davon wurde eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungsstufen  $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$  angelegt. Ziel ist es eine Plasmidmenge von höchstens 300 Kopien (entspricht der Verdünnungsstufe  $10^{-6}$ ) nachweisen zu können, da im späteren ES-Zellscreen auch eine geringe DNA-Menge durch die PCR detektiert werden muss. Zusätzlich wurde der PCR noch MIA PaCa-2 Zell-DNA zugegeben, um die Situation der später ablysierten ES-Zellen realistischer zu gestalten. Erst bei einem Nachweis der Verdünnungsstufe von  $10^{-6}$  des Plasmids kann von einer ausreichenden Sensitivität der Screen-PCR ausgegangen werden.

Für die Testung der Verdünnungsreihe wurde wiederum das Primerpaar Hprt-ES-sc-UP1 und CAG-sc-LP3 verwendet und ein Temperaturgradient von 55°C bis 68,3°C getestet. Dabei zeigte sich bei einer Temperatur von 67°C auch noch bei der niedrigsten Verdünnungsstufe von  $10^{-8}$  eine spezifische Bande bei 3253bp (Abbildung 46). Damit war die Screen-PCR ausreichend sensitiv und die Voraussetzungen für die Elektroporation in ES-Zellen gegeben.



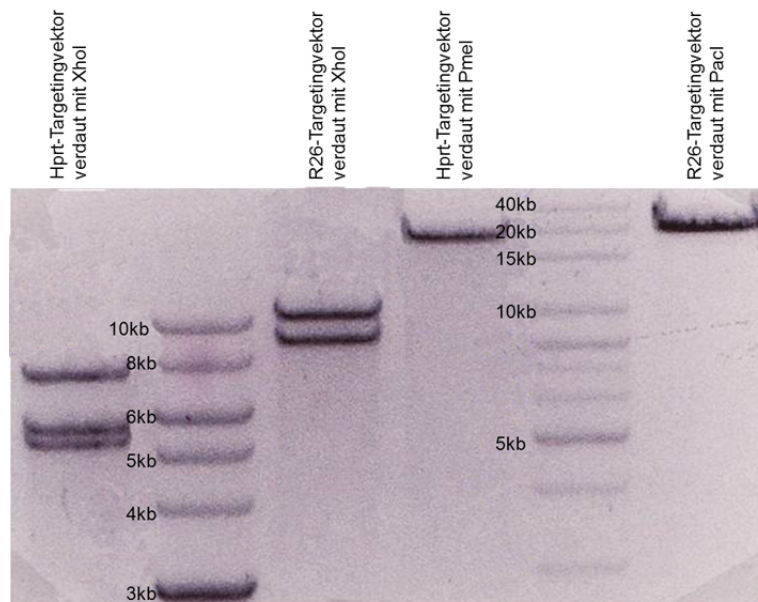
**Abbildung 46: Etablierung der ES Screen-PCR der Hprt-Klone.** Bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-8}$  ist eine spezifische Bande bei ~3,3kb sichtbar.



## 5.4 Herstellung und Screening von rekombinanten ES-Zellen zur Injektion

### 5.4.1 ES-Zell Elektroporation

Für die Elektroporation in männliche IDG3.2 ES-Zellen ((C57BL/6J x 129S6/SvEvTac) F1) wurde von beiden Targetingvektoren endotoxinfreie DNA durch das *EndoFree Plasmid Maxi Kit* gewonnen und diese für eine höhere Aufnahme und Integration linearisiert (Abbildung 47). Die Linearisierung erfolgte für den ROSA26-Targetingvektor durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *PacI* und für den *Hprt*-Vektor mit *PmeI*. Die Vollständigkeit der Plasmide wurde noch zusätzlich über einen *XhoI*-Verdau geprüft.



**Abbildung 47: Überprüfung und Linearisierung der Targetingvektoren für die Elektroporation in IDG3.2 ES-Zellen.** Beide Plasmide wurden auf Vollständigkeit durch *XhoI*-Verdau geprüft (als Größenstandard wurde die *2-Log DNA Ladder* verwendet). Für den ROSA26-Lokus wurde die Linearisierung mit *PacI* und für den *Hprt*-Lokus mit *PmeI* durchgeführt (Größenstandard: *1Kb DNA Extension Ladder*).

### 5.4.2 Nachweis korrekt integrierter ROSA26 ES-Zellen

#### *Selektion der elektroporierten ES-Zellen der ROSA26-Linie*

Einen Tag nach der Elektroporation wurde mit G418 (140µg/ml) versetztem Kulturmedium für sieben Tage selektioniert. Nur ES-Zellen mit integriertem Transgen besitzen eine Neomycinresistenz durch Insertion einer neo-Kassette im

Targetingvektor als positiven Selektionsmarker und überleben dadurch die Selektion. Als negativer Selektionsmarker wurde das Diphterietoxin verwendet, das sich hinter dem langen homologen Arm des ROSA26-Targetingvektors befand. Dieses führt zum Absterben derjenigen Zellen, die durch Integration den kompletten Endvektor enthalten, weil es die Proteinbiosynthese hemmt.

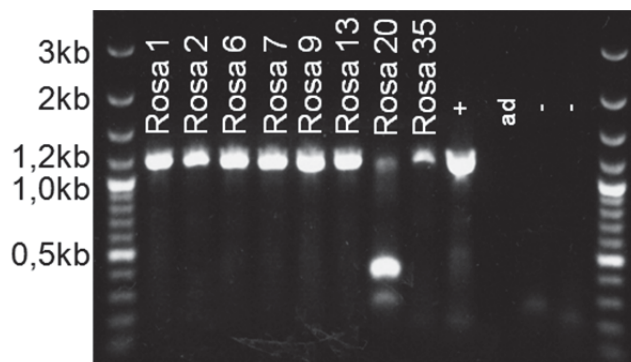
Für die ROSA26-Linie wurde eine sogenannte *gene trap mutagenesis* genutzt, bei der nur ES-Zellen mit Rekombination des Plasmids in Loci mit funktionalen Promotorsequenzen wie z.B. dem ROSA26-Lokus in der Lage waren, die Resistenz zu exprimieren, da im Targetingvektor kein Promotor eingefügt ist und damit lediglich der endogene (genomische) Promotor des Lokus die Expression ermöglicht. Nach homologer Rekombination in das murine Genom (Abbildung 51) kontrollierte der ROSA26-Promotor das Transgen, was die Anzahl potentiell positiver Einzelklone reduzierte.

Nach sieben bis zehn Tagen waren insgesamt 53 selektionsresistente Einzelklone zu erkennen, die vereinzelt wurden und nach Expansion auf korrekte Integration mittels PCR überprüft wurden. Auf der Kontrollplatte dagegen waren die unelektroporierten Zellen abgestorben, was die Wirksamkeit der positiven Selektion mit neo bewies.

### ***Nachweis der korrekten, einmaligen Rekombination der ROSA26 ES-Zellklone***

#### *Überprüfung der Integration im ROSA26-Lokus*

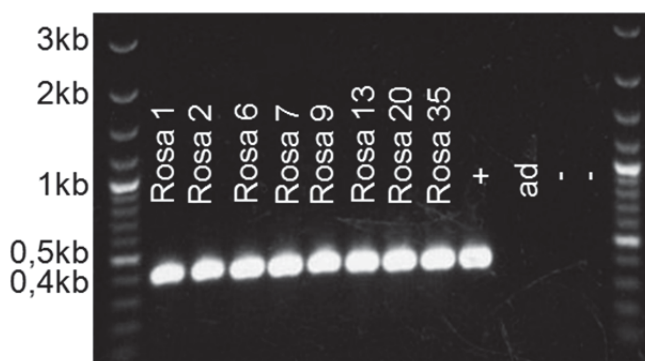
Die Klone wurden nach Selektion gepickt und über die bereits im Vorfeld beschriebene ES Screen-PCR geprüft. Diese PCR verwendete einen Primer mit einer Hybridisierung an endogene ROSA26-Sequenzen und einen Primer mit Hybridisierung nur im 5'-Bereich des Targetingvektors, wodurch die korrekte Lage des Vektors im ROSA26-Lokus verifiziert wurde. Als Positivkontrolle wurde ein Lysat der P141PPT2-Zellen und als Negativkontrollen Lysate von zwei unterschiedlichen WT ES-Zelllinien verwendet. Die Wasserkontrolle (ad) wurde für die Bestätigung der Reinheit der PCR genutzt. Sieben Klone, mit Ausnahme des ROSA-Klons 20, zeigten die gewünschte Bande bei 1194bp (Abbildung 48). Die Klone wurden noch durch weitere PCRs und TaqMan geprüft.



**Abbildung 48: ES Screen-PCR der ROSA26-Zellklone.** Korrekte Integration in den ROSA26-Lokus ergab eine spezifische Bande bei 1194bp.

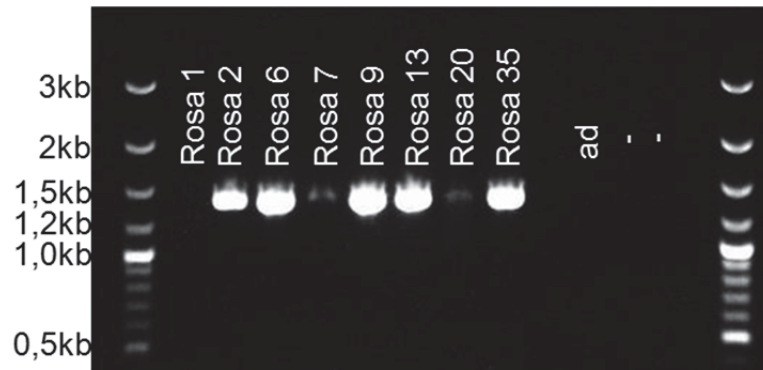
#### *Überprüfung der Vollständigkeit der Integration*

Eine vollständige Integration des Plasmids wurde durch eine PCR der pA-site und der STOP-*Txnrd2*-Kassette ermittelt. Die in der Screen-PCR positiven Klone zeigten in der Überprüfung der pA-site alle eine spezifische Bande bei 440bp (Abbildung 49). Wie auch bei der vorhergehenden ES Screen-PCR wurden als Positivkontrolle das Lysat der Zelllinie P141PPT2 und als Negativkontrollen die Lysate zweier WT ES-Zelllinien verwendet. Die Reinheit wurde durch eine Wasserkontrolle geprüft.



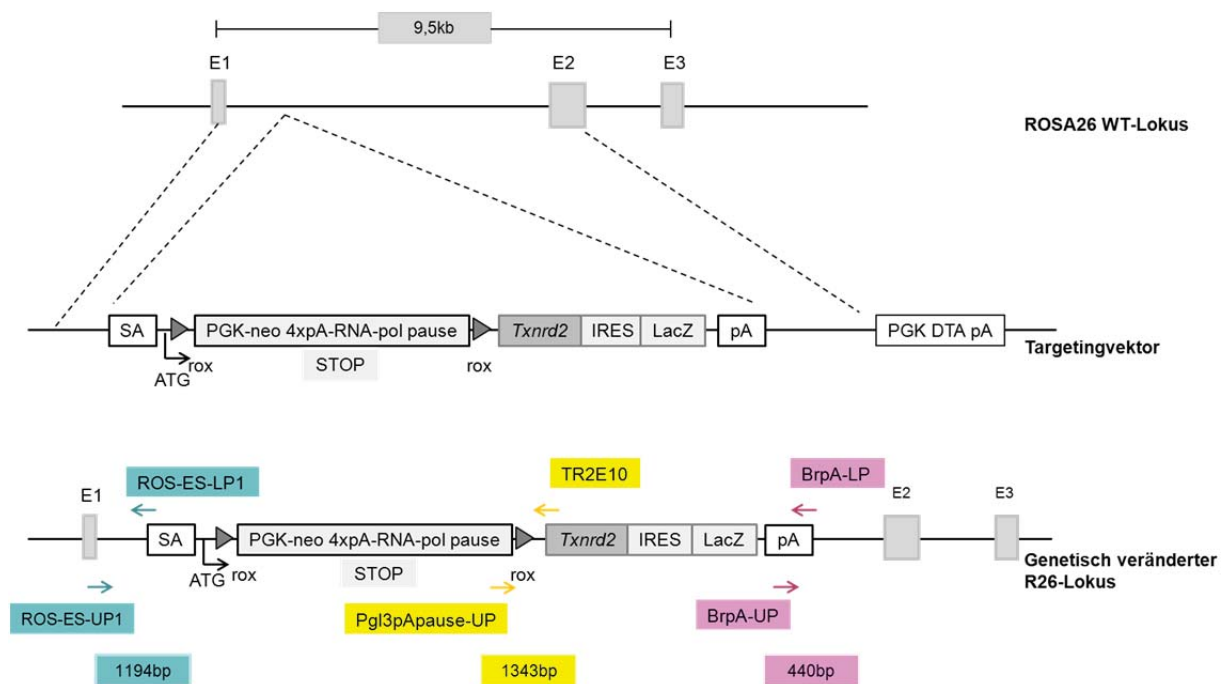
**Abbildung 49: Überprüfung der Anwesenheit der pA-site der ROSA26-Klone.** Eine vollständige Integration des Plasmids konnte bei einer spezifischen Bande von 440bp verifiziert werden.

Nach Prüfung der STOP-*Txnrd2*-Kassette erwiesen sich nur sechs Klone als vollständig integriert (Abbildung 50). Für diese PCR wurden die WT ES-Zelllysate als Negativkontrolle eingesetzt und auch eine Wasserkontrolle zur Reinheitsprüfung. Jedoch stand in diesem Fall keine Positivkontrolle zur Verfügung.



**Abbildung 50: Überprüfung der Vollständigkeit des homolog rekombinierten Transgens durch PCR an der STOP-*Txnrd2*-Kassette.** Die ROSA26-Klone 2, 6, 7, 9, 13 und 35 zeigten die korrekte Bande bei 1343bp.

Nach Durchführung der drei PCRs zur Überprüfung der korrekten Integration in das Intron 1 des ROSA26-Lokus (Abbildung 51) erwiesen sich somit sechs von acht Klone (75%) als positiv.



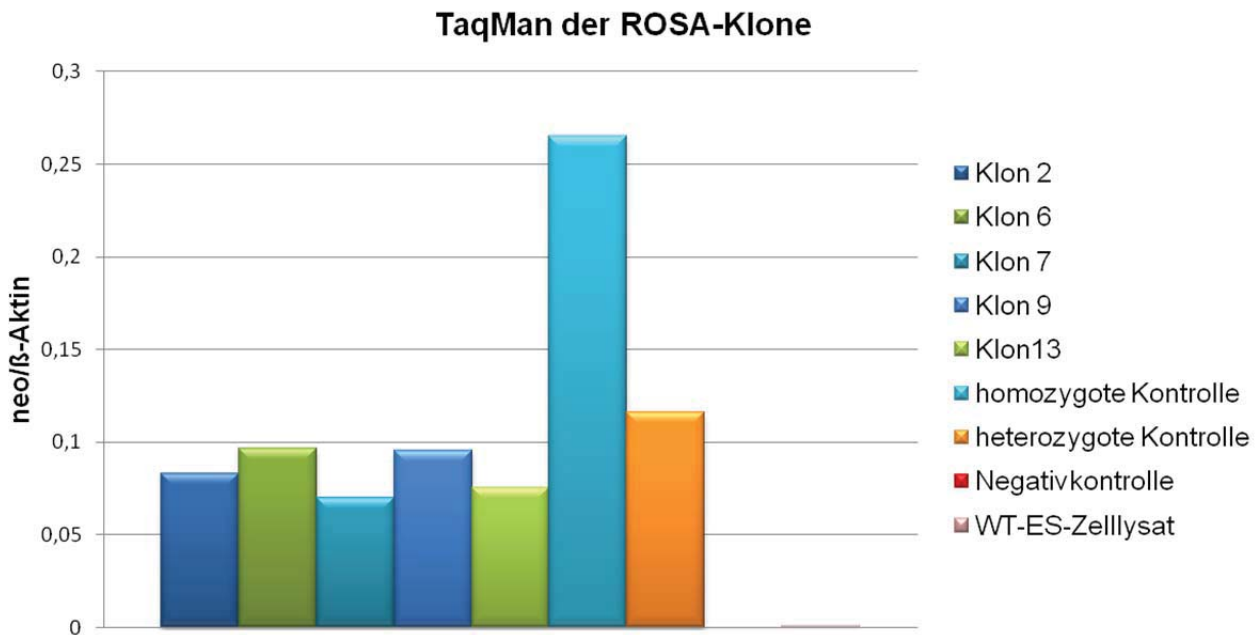
**Abbildung 51: Schema der homologen Rekombination des Targetingvektors pROSA-roxSTOPProx-*Txnrd2*-iresLacZ in das Intron 1 des ROSA26-Lokus.** Farblich markiert sind die Primerpaare für die Bestätigung der korrekten Integration einer Einzelkopie.

### *Überprüfung der Einfachintegration*

Mit den bisher gezeigten PCR-Screens wurde zwar die richtige Lage und Orientierung, sowie die Vollständigkeit des Plasmids geprüft, jedoch noch nicht die Häufigkeit der Integration. Zur Bestätigung der Rekombination einer Einzelkopie des Transgens in den ROSA26-Lokus wurde eine quantitative *real-time* PCR (TaqMan) durchgeführt, bei der eine relative Quantifizierung durch das Verhältnis der ct-Werte von Neomycin zu dem Referenzgen  $\beta$ -Actin ermöglicht wurde. Da der Gehalt des Referenzgens in allen Zellen gleich ist und nur durch Mehrfachintegration von neo sich das Verhältnis von  $\beta$ -Aktin zu neo ändern kann, wurden die ct-Werte von neo im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin gesetzt. Damit ergab sich die Möglichkeit der relativen Quantifizierung zur Kontrolle der Einfach- oder Mehrfachintegration von Neomycin-Phosphotransferase II.

Zum Vergleich des Gehalts an neo und somit zum Nachweis der Integrationshäufigkeit des Transgens wurde zusätzlich DNA von Gewebeproben mehrerer Mauslinien als Kontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde DNA einer Wildtyp-Maus verwendet, deren Genom unverändert ist und keine neo-Kassette enthält, sowie ein Zelllysate der WT-ES-Zellen. Eine heterozygot transgene Maus, die nur auf einem Allel eine Kopie der neo-Kassette enthält, entspricht in ihrem neo/ $\beta$ -Aktin Verhältnis einer Einfachintegration des Transgens. Auch eine homozygot transgene Maus, die auf beiden Allelen die neo-Kassette aufweist, wurde als Vergleich einer Mehrfachintegration mitgeführt. Dabei entsprach das heterozygote Lysat der korrekten homologen Rekombination in ES-Zellen, da der Targetingvektor nur auf einem Allel rekombinierte.

Die Auswertung der *real-time* PCR ergab bei allen fünf geprüften ES-Zellklonen ein neo/ $\beta$ -Aktin Verhältnis, das annähernd der heterozygoten Kontrolle entsprach. Dies bestätigte die Integration einer Einzelkopie in den R26-Lokus (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Überprüfung der Häufigkeit der Integration des Transgens in den ROSA26-Lokus.** Die Klone zeigten ein neo/β-Aktin Verhältnis, das dem der heterozygoten Kontrolle und damit einer Einfachintegration entsprach.

Somit ergab sich eine Frequenz der korrekten homologen Rekombination in den ROSA26-Lokus von ~9% der analysierten Klone. Als nächster Schritt erfolgte die Injektion von drei ES-Zellklonen (Klon 9, 2, und 6) in BDF1 Blastozysten des Hybrid-Mausstammes B6D2F1/J, aus der Kreuzung von C57BL/6J Weibchen und DBA/2J Männchen.

#### 5.4.3 Nachweis korrekt integrierter Hprt ES-Zellen

##### *Selektion der elektroporierten ES-Zellen der Hprt-Linie*

Auch bei der Hprt-Linie erfolgte einen Tag nach der Elektroporation die positive Selektion mit G418 (140 µg/ml) versetztem Kulturmedium für mindestens sieben Tage. Dabei überlebten nur Zellen, die über die Integration des Targetingvektors eine Neomycinresistenz als positiven Selektionsmarker besaßen. Als negativer Selektionsmarker wurde auch hier das Diphterietoxin verwendet, das außerhalb des langen homologen Arms im Endvektor vorhanden war. Dieses musste bei korrekter Rekombination verloren gehen und ermöglicht so den Zellen zu überleben. Die Wirksamkeit der Selektion mit G418 wurde auch in diesem Fall mit einer Kontrollplatte nachgewiesen, bei der die unelektroporierten Zellen abstarben.

Nach Vereinzelung der Klone erfolgte eine weitere Selektion mit 6-Thioguanin (6-TG; 10µM) über 14 Tage, um die Anzahl der potentiell positiven Klone noch einmal zu reduzieren. Da der Hprt-Lokus durch die homologe Rekombination des Targeting-vektors in das Exon 3 nicht mehr funktionsfähig war, war eine Selektion durch sog. Komplementation möglich. Bei dieser können Zellen nur in speziellen Medien wachsen, mit denen ein Defekt der Zellen kompensiert wird oder wie in diesem Fall ein Funktionsverlust innerhalb des Lokus einen Signalweg unterbricht und die Zellen dadurch der toxischen Wirkung des Selektionsmediums entgehen. Durch den funktionsunfähigen *purin salvage pathway* können die Hprt-defizienten Zellen das toxische 6-TG nicht in ihre DNA einbauen und überleben deshalb.

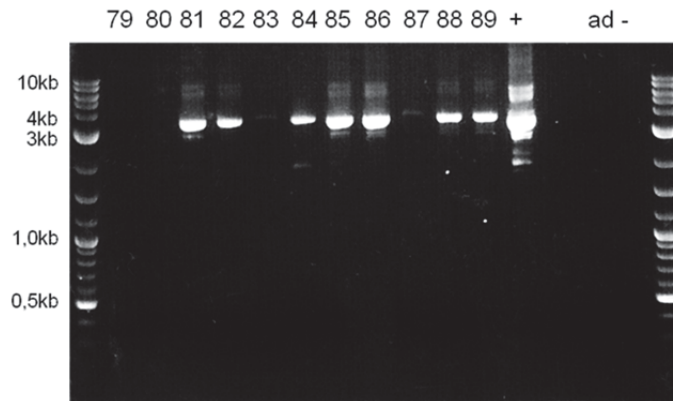
Es wurden insgesamt 791 Einzelklone gepickt, vereinzelt und nach Expansion auf homologe Rekombination mittels Screen-PCR geprüft.

### ***Nachweis der korrekten, einmaligen Rekombination der Hprt ES-Zellklone***

#### *Überprüfung der Integration in den Hprt-Lokus*

Die Klone wurden über die bereits im Vorfeld etablierte ES Screen-PCR geprüft, wo ein DNA-Fragment amplifiziert wird, das endogene genomische Anteile und spezifische Vektorsequenzen des 5'-Bereichs umfasst. Damit konnte die 5' Integration des Transgens in den Hprt-Lokus bestätigt werden. Als Positivkontrolle diente das Plasmid pDTA-P<sub>Hprt</sub>-Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 mit der einklonierten Primerbindungsstelle P<sub>Hprt</sub>. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle in Form von WT-ES-Zellen, wie auch eine Wasserkontrolle zur Überprüfung der Reinheit der PCR verwendet. Insgesamt konnten 49 PCR-positive Einzelklone nachgewiesen werden (Abbildung 53), was einer Rekombinationsrate von 6% entspricht.





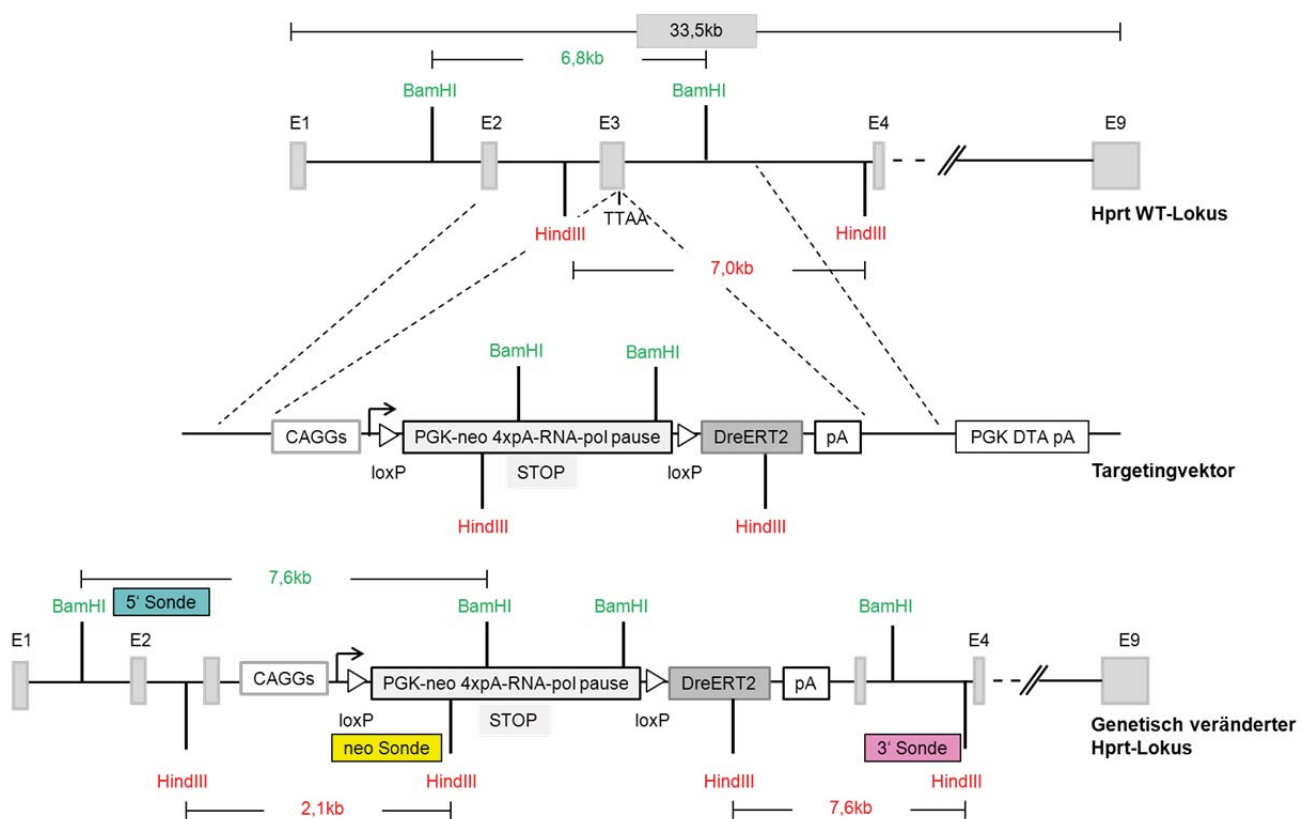
**Abbildung 53: Bestätigung der 5' homologen Rekombination des Targetingvektors in den Hprt-Lokus.** Von 791 konnten insgesamt 49 Einzelklone in der PCR durch eine spezifische Bande bei 3253bp bestätigt werden.

### *Southern Blot*

Einseitig per PCR als positiv rekombiniert erkannte ES-Zellklone wurden hinsichtlich homologer Rekombination in das Exon 3 des Hprt-Lokus (Abbildung 54) und zum Ausschluss von Mehrfachintegrationen mittels Southern Blot getestet. Dazu wurde zunächst ein enzymatischer Restriktionsverdau der DNA durchgeführt, der so gewählt sein muss, dass neben dem WT-Fragment ein charakteristisches DNA-Fragment erkennbar ist. Da das Restriktionsenzym unterschiedlich verteilt im Genom schneidet, gibt es Fragmente jeder Größe, so dass in der Agarosegelelektrophorese keine Banden, sondern eine gleichmäßige Verteilung der DNA sichtbar wird. Zur Darstellung spezifischer Banden wird die DNA deshalb mit Oligonukleotiden, die radioaktiv markiert sind (Sonden), hybridisiert. Die externen 5' und 3' Sonden befinden sich dabei außerhalb des homologen Bereichs, um illegitime Rekombinationen ausschließen zu können. Mit einer internen neo-Sonde werden zusätzliche Integrationen erkannt. Die einzelnen ES-Zellklone wurden zunächst mit einer externen 5'-Sonde, die außerhalb des kurzen homologen Arms bindet, getestet. Durch Restriktionsverdau mit BamHI-HF entstehen bei homolog rekombinierten ES-Zellklonen dabei DNA-Fragmente mit einer Größe von 7,6kb im Gegensatz zu 6,8kb des WT-Allels, da mit dem Transgen eine zusätzliche BamHI-Schnittstelle in homolog rekombinierte ES-Zellklone eingefügt wurde (Abbildung 54). Die externe 3'-Sonde, die außerhalb des langen homologen Arms bindet, wurde mit einem Southern Blot nach HindIII-HF Restriktionsverdau getestet. Auch hier war zusammen mit dem Transgen eine zusätzliche HindIII-Schnittstelle in homolog rekombinierte Einzelklone

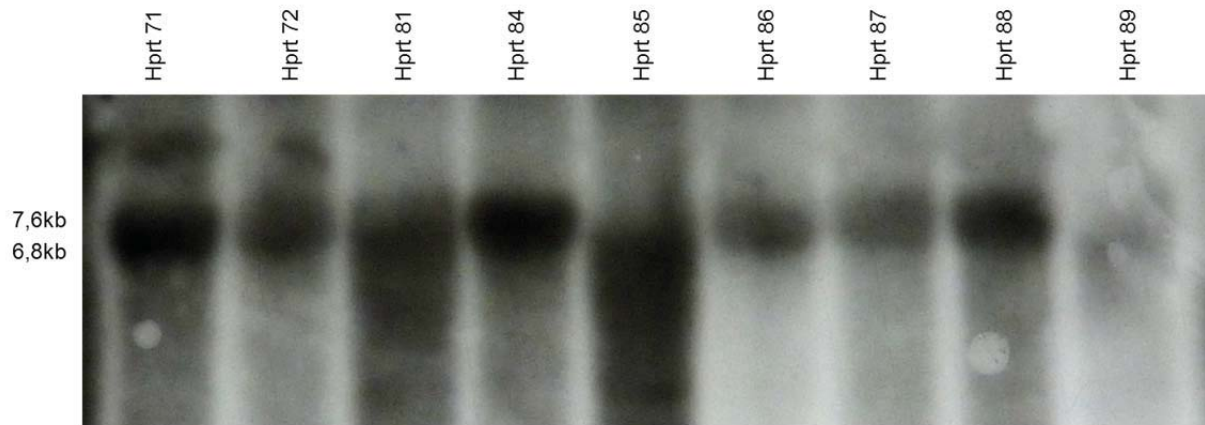


eingbracht worden und ergab DNA-Fragmente von 7,6kb anstelle der WT-Bande von 7,0kb (Abbildung 54). Zum Ausschluss von zusätzlichen, illegitimen Integrationen wie auch Mehrfachintegrationen des *gen targeting* Konstrukts in andere Bereiche des Genoms wurden die ES-Zellklone nach HindIII-HF Verdau mit einer internen neo-Sonde getestet, die Teile des Gens für die neo-Kassette spezifisch bindet. Somit ergab sich bei homolog rekombinierten ES-Zellklonen eine spezifische Bande von 2,1kb (Abbildung 54).

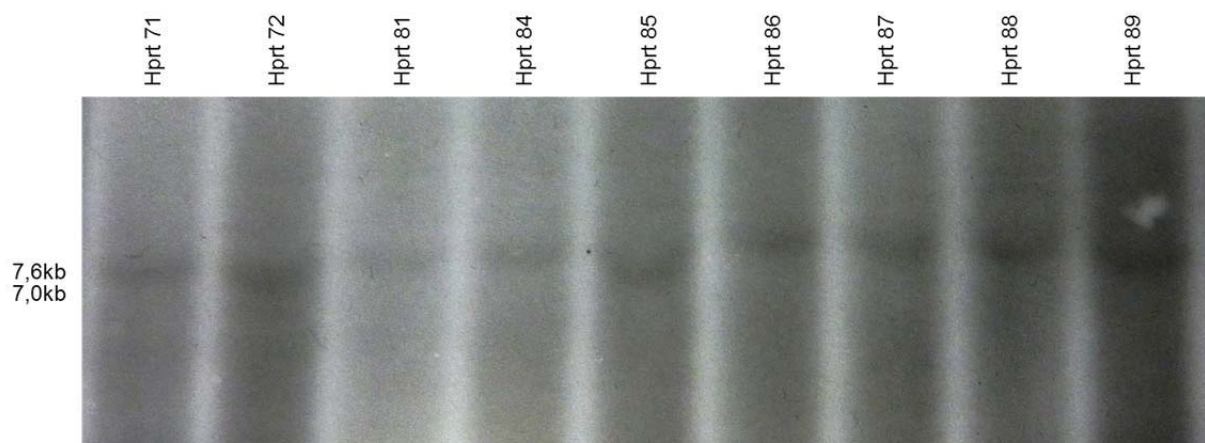


**Abbildung 54: Schema der homologen Rekombination des Targetingvektors pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 in das Exon 3 des Hprt-Lokus.** In Farbe sind die Schnittstellen BamHI und HindIII dargestellt sowie die Lage der Sonden farbig markiert.

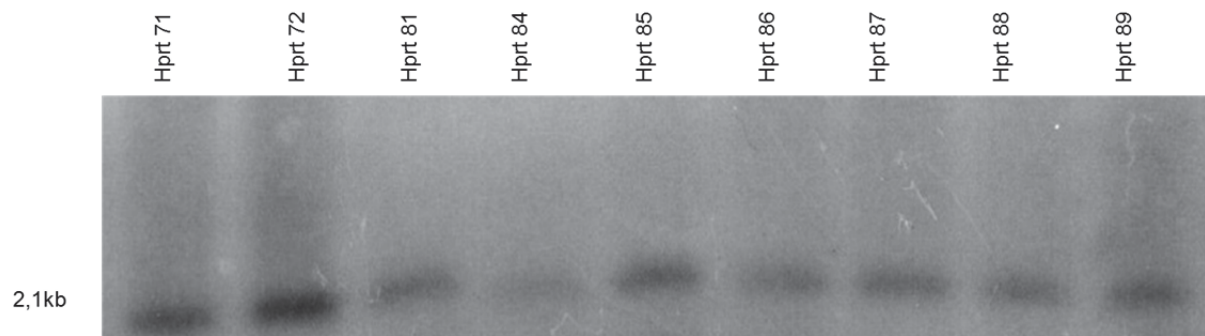
## Ergebnisse



BamHI-Verdau mit 5'-Sonde



HindIII-Verdau mit 3'-Sonde



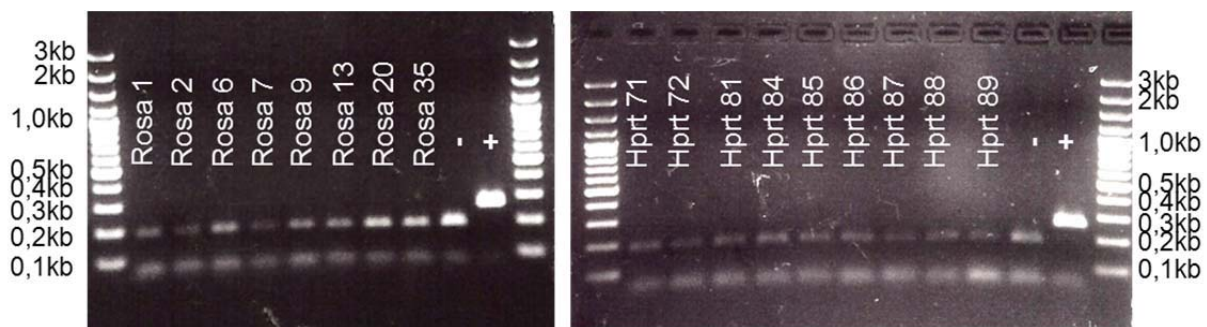
HindIII-Verdau mit neo-Sonde

**Abbildung 55: Bestätigung der korrekten, einmaligen Rekombination des Transgens in den Hprt-Lokus.** Von insgesamt neun getesteten ES-Zellklonen konnten sieben (Klon 71, 72, 81, 84, 86, 87, 88) durch Southern Blot Analyse mit einiger Sicherheit als einmalig korrekt integriert bestätigt werden.

Von insgesamt neun getesteten ES-Zellklonen konnten sieben (Klon 71, 72, 81, 84, 86, 87, 88) mit einiger Sicherheit als homolog rekombiniert identifiziert werden (Abbildung 55), die für eine noch folgende Blastozysteninjektion zur Verfügung stehen. Damit lag die Frequenz der korrekten homologen Rekombination bezogen auf die Gesamtanzahl der Screen-PCR positiven Einzelklone bei 14%.

### 5.5 Mykoplasmentest ROSA26- und Hprt-Klone

Korrekt rekombinierte ES-Zellklone wurden mit dem *Venor® GeM OneStep Kit* auf Mykoplasmenkontamination geprüft und als Mykoplasmen-negativ bestätigt (Abbildung 56).



**Abbildung 56: PCR auf Mykoplasmenfreiheit der ROSA26- und Hprt-Klone.** Alle ES-Zellklone, die durch PCRs/TaqMan (ROSA26) bzw. durch Southern Blot (Hprt) als korrekt homolog rekombiniert ermittelt wurden, erwiesen sich als Mykoplasmen-negativ. Bei einer Mykoplasmen-Kontamination erscheint eine Bande bei ca. 267bp und bei einer negativen Probe die interne Kontrolle bei 191bp.

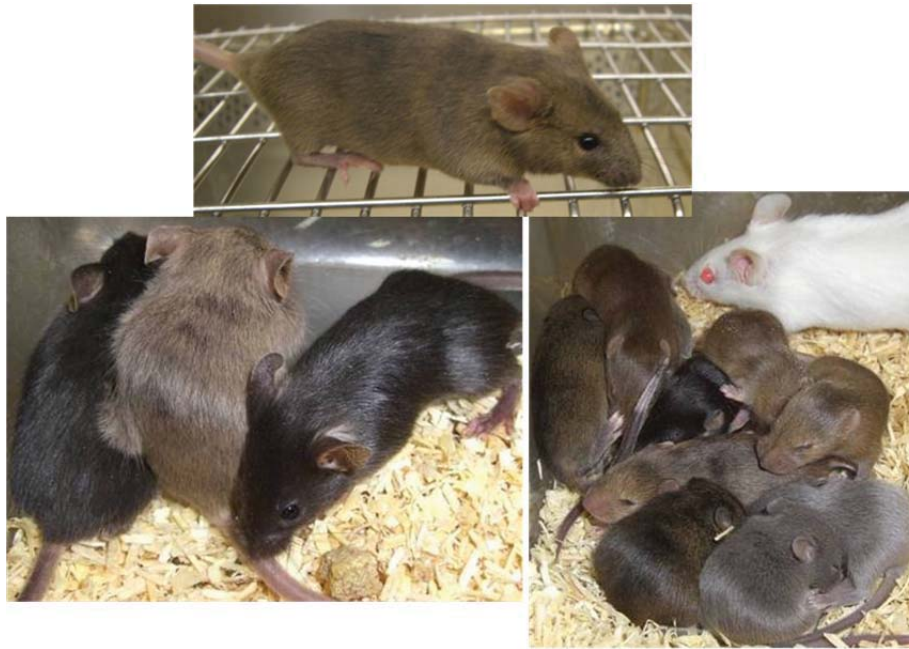
### 5.6 Herstellung und Screening von chimären Mäusen

#### 5.6.1 Injektion der ROSA26 ES-Zellklone in BDF1-Blastozysten

Die Injektion der als homolog rekombiniert geprüften ES-Zellklone der ROSA26-Linie in BDF1-Blastozysten wurde von der *Animal Model Generation Group* des Instituts für Entwicklungs-genetik (IDG) des Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Der anschließende Transfer in 8 bis 10 Wochen alte Rezipienten der Auszuchtlinie Crl:CD-1 (ICR)/DCM (*Department of Comparative Medicine*; CD-1) erfolgte durch das Embryotransfer- und Cryoservice Team der Abteilung für Vergleichende Medizin (AVM) des Helmholtz Zentrum München.

### **5.6.2 Anzahl der sich entwickelten Nachkommen und Bestimmung des Grades an Chimärismus**

Die sich nach Blastozysteninjektion entwickelnden Tiere werden als genetische Chimären bezeichnet, da sie sowohl Anteile der ES-Zelle und damit des Transgens, als auch der Blastozyste und damit des Wildtyps besitzen. Dies ist auch anhand der Fellfarbe zu erkennen, da die Tiere für die ES-Zellgewinnung eine andere Fellfarbe aufweisen als die Tiere zur Blastozystengewinnung. Somit kann bereits anhand der Fellfarbe der Grad an Chimärismus und damit der Grad an Transgenität abgeschätzt werden. Die mit den homolog rekombinierten ES-Zellklonen 9, 2 und 6 injizierten BDF1-Blastozysten wurden durch Embryotransfer in scheinträchtige, synchronisierte CD1-Rezipienten übertragen. Von Klon 6 und 9 wurden jeweils 42 Blastozysten und von Klon 2 insgesamt 47 Blastozysten in je zwei Rezipienten transferiert. Es wurden insgesamt 38 Nachkommen geboren (1. Transfer: 9 Nachkommen, 2. Transfer: 12 Nachkommen, 3. Transfer: 17 Nachkommen), von denen 16 Tiere (42%) (1. Transfer: 3 Tiere (33%), 2. Transfer: 4 Tiere (33%), 3. Transfer: 9 Tiere (53%)) ein schwarz-agouti farbenes Fell aufwiesen und damit chimär waren. Der Chimärismusgrad der Fellfarbe betrug dabei bis zu ca. 70% für die transgenen Zellen (Abbildung 57). Die Tiere wurden auf Anwesenheit des homolog rekombinierten Allels mittels ES Screen-PCR und der PCR der *pA-site/STOP-Txnrd2*-Kassette anhand von Schwanzspitzen-DNA untersucht (Tabelle 11). Dabei wurden alle chimären Tiere als transgen bestätigt.



**Abbildung 57: Chimärismusgrad der F0-Generation.** Das Fell der Chimären wies einen bis zu 70%igen Grad an Chimärismus auf (Anteil des agouti-farbenen Fells der ES-Zellen zum schwarzen Fell der Blastozyste).

### **5.7 Rückkreuzung der Chimären und Test auf Keimbahntransmission**

Mit Erreichen der Geschlechtsreife (siebte bis achte Lebenswoche) wurden die Chimären auf Keimbahntransmissivität, also die Weitergabe des Transgens durch die Keimzellen an die Nachkommen, analysiert. Dazu wurden männliche Chimären mit Weibchen der Linie C57BL/6N/DCM verpaart. Da die für das *gene targeting* verwendete ES-Zelllinie einen männlichen Karyotyp besitzt, werden keine weiblichen Chimären für die Zucht der transgenen Linie verwendet. Diese sind häufig infertil und weisen oftmals keine Keimbahntransmission auf (Ware et al., 2003). Insgesamt wurden 12 Zuchtpaare angesetzt, aus denen 70 Nachkommen hervorgingen. Die F1-Generation wurde durch Genotypisierung auf das Transgen und damit Heterozygotie mit der ES Screen-PCR sowie der PCR für die pA-site als auch für die STOP-*Txnrd2*-Kassette getestet. 21 Tiere (30%) wiesen die erwünschte genetische Veränderung auf und somit konnte die Keimbahntransmission des Transgens durch sieben Chimären (58%) verifiziert werden.



### **5.8 Funktioneller Test der ROSA26-Maus durch Kreuzung mit einem ubiquitären Dre-deleter**

Zur Bestätigung der Funktionalität des Transgens im ROSA26-Lokus wurden die heterozygoten F1-Nachkommen mit CAGGs-Dre Tieren (ubiquitäre Dre-*deleter* Linie; (Anastassiadis et al., 2009)) gekreuzt, um das konditionale *Txnrd2* Allel ubiquitär in allen Geweben zu aktivieren. Die Embryonen wurden 14.5 Tage p.c. präpariert und der Genotyp mittels CAGGs-Dre und R26 PCR geprüft. Von insgesamt 23 Embryonen wiesen sechs Tiere (26%), was den Mendelschen Regeln entspricht, sowohl eine spezifische Bande von 314bp bei der CAGGs-Dre PCR (Tabelle 16), wie auch eine spezifische WT-Bande bei 600bp und Mutanten-Bande bei 400bp bei der R26 PCR (Tabelle 17) auf. Bei diesen Tieren rekombiniert Dre die *rox-sites* in ROSA26-roxSTOPprox-*Txnrd2*-IresLacZ, so dass mit Entfernung der STOP-Kassette *Txnrd2*-IresLacZ als Einheit abgelesen und exprimiert wird. Dies wurde durch eine  $\beta$ -gal Färbung der Embryonen untersucht (Abbildung 58). Jedes der sechs genotypisch positiven Tiere zeigte dabei eine ubiquitäre Blaufärbung und damit konnte die Funktionalität des Transgens verifiziert werden. Im Gegensatz dazu waren die übrigen 17 Tiere LacZ negativ (Tabelle 20). Zwei dieser negativen Tiere waren CAGGs-Dre PCR negativ, zeigten jedoch die spezifische Mutanten-Bande in der R26 PCR. Somit konnte ebenso gezeigt werden, dass die STOP-Kassette in vivo dicht ist, also keine *Txnrd2*-IresLacZ Expression stattfindet.



**Abbildung 58:  $\beta$ -gal Färbung von Embryonen am Embryonaltag E14.5 aus der Verpaarung CAGGs-Dre mit ROSA26-roxSTOPProx-Txnrd2-IresLacZ.**  $\beta$ -gal positive Tiere (rechter Embryo) weisen eine Rekombination der rox-sites durch Dre mit Entfernung der STOP-Kassette und damit der Expression von Txnrd2-IresLacZ als Einheit nach. Embryonen, die genotypisch nur das veränderte R26-Allel aufwiesen, zeigten keine  $\beta$ -gal Färbung (linker Embryo) und damit konnte die Dichtigkeit der roxSTOPProx-Kassette auch in vivo bestätigt werden.

**Tabelle 20: Gesamtanzahl  $\beta$ -gal gefärbter Tiere mit Darstellung der Genotypen.**

Tiere	CAGGs-Dre	R26-Txnrd2	WT-Txnrd2	nlsLacZ-Färbung
6	+	+	+	+ (blau)
17 {	-	+	+	- (weiß)
	+	-	+	- (weiß)
	-	-	+	- (weiß)
23				



## 6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Tiermodells, mit dessen Hilfe man exemplarisch den genetischen *rescue* der mitochondrialen Thioxygenreduktase in deren pankreasspezifischem *knockout* konditional testen kann.

Durch den genetischen *rescue* soll in weiteren Arbeiten festgestellt werden, ob der in einem pankreasspezifischen konditionalen *Txnrd2* knockout-Modell beschriebene Phänotyp (Aichler, 2007) durch den induzierbaren *knockin* desselben Gens beeinflusst werden kann oder gar reversibel ist.

Basierend auf der Cre/loxP Technologie, mit deren Hilfe die embryonale Letalität des generellen *Txnrd2-knockouts* umgangen wurde, wurde eine Komplementationsstrategie mit dem im Jahr 2004 entdeckten Dre/rox Rekombinationssystem gewählt (Sauer & Mcdermott, 2004). Diese Kombination kam zum Einsatz, da beide Systeme bei hoher Rekombinationseffizienz keine Kreuzrekombination zeigen (Sauer & Mcdermott, 2004; Anastassiadis et al., 2009). Für diese Arbeit wurden die zwei Targetingvektoren pROSA-roxSTOProx-*Txnrd2*-lresLacZ und pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 erzeugt. Vor Elektroporation in murine IDG3.2 ES-Zellen wurden die einzelnen Module beider Konstrukte auf Funktionalität in vitro getestet. Danach erfolgte durch homologe Rekombination die Integration der Targetingvektoren in die Genloci ROSA26 und Hprt des Mausgenoms. Nach Überprüfung rekombinanter ES-Zellen auf einmalige, korrekte Integration wurden die ES-Zellen der ROSA26-Linie bereits in BDF1-Blastozysten mikroinjiziert und in CD1-Rezipienten transferiert. Durch Rückkreuzung mit C57BL/6N-Tieren konnte die Keimbahngängigkeit der Chimären durch Erhalt transgener F1-Nachkommen bestätigt werden. Diese wurden anschließend mit ubiquitären Dre-deleter Mäusen verpaart (Anastassiadis et al., 2009). Durch  $\beta$ -gal Färbung der Embryonen (E14.5) konnte durch die ubiquitäre LacZ-Expression die in vivo Funktion der ROSA26-Linie bestätigt werden.

### 6.1 Klonierung der Targetingvektoren

#### 6.1.1 Klonierungsstrategie - Verwendete Rekombinationssysteme

Für diese Arbeit wurden die zwei Rekombinationssysteme Cre/loxP und Dre/rox verwendet.

Das Cre/loxP-Rekombinationssystem ist als Modifikationswerkzeug des Säuger-genoms bereits etabliert und zeichnet sich durch eine hohe Rekombinationseffizienz aus (Nagy, 2000; Yu & Bradley, 2001). Es ist für den bereits bestehenden pankreasspezifischen *Txnrd2-knockout* durch Kreuzung einer durch den PTF1a-Promotor getriebenen Cre-rekombinanten Mauslinie mit einer geflochten *Txnrd2*-Mauslinie verwendet worden.

Zur Etablierung des induzierbaren *knockins* der *Txnrd2* wurden nunmehr zwei Targetingvektoren unter Verwendung des Dre/rox-Systems generiert. Da keinerlei Kreuzrekombination zwischen dem Cre/loxP- und dem Dre/rox-System festgestellt werden konnte (Sauer und McDermott, 2004; Anastassiadis et al., 2009), ist eine gleichzeitige Kombination beider Systeme möglich. Vorteil der beiden Rekombinasen ist das bei 37°C liegende Temperaturoptimum, welches bestens für Arbeiten in Mausmodellen geeignet ist. Ebenso sind die Erkennungsstellen für eine Integration in das murine Genom geeignet, weil sie klein sind und zu große Sequenzbereiche eine Leserasterverschiebung an der Integrationsstelle bewirken und dadurch die Expression angrenzender Bereiche beeinflussen könnten. LoxP und rox sind nur 34bp bzw. 32bp groß, wodurch das Risiko der Beeinflussung benachbarter Genombereiche gering ist. Zugleich sind sie jedoch lang genug, um nicht zufällig im Genom aufzutreten, so dass das Risiko ungewollter Rekombinationen in anderen Genombereichen außerhalb der Integrationsstelle minimiert ist. Jedoch besteht dennoch die geringe Wahrscheinlichkeit der Rekombination endogen vorhandener „Pseudo-lox Stellen“ im Genom (Thyagarajan et al., 2000). Dies ist bisher für die rox-sites noch nicht beschrieben. Ein weiterer Vorteil beider Systeme liegt darin, dass sie keine zusätzlichen Cofaktoren, wie Phagen- oder Bakterienproteine benötigen (Sauer & McDermott, 2004). Außerdem funktionieren beide Systeme über Megabasen-Abstände, wodurch die Rekombination großer Genabschnitte ermöglicht wird. Dafür ist der Zeit- und Arbeitsaufwand für eine solche konditionale Rekombination im Vergleich zum schlichten *knockout* deutlich höher.

### **6.1.2 Klonierungsstrategie – Induktion der *Txnrd2*-Expression**

Eine der geplanten Mauslinien besitzt im Hprt-Lokus eine ausgestoppte DreERT2-Kassette. Deren Expression findet erst nach Rekombination ihrer loxP-sites unter Entfernung der vorgeschalteten STOP-Kassette während der Embryonalphase durch die Cre-Rekombinase des zugrundeliegenden *knockouts* statt.

Im ROSA26-Lokus, der durch die zweite, schon neu generierte Mauslinie eingebracht wird, erfolgt dann die Rekombination der *rox-sites* und damit die Entfernung der vor *Txnrd2*-IresLacZ vorgeschalteten STOP-Kassette durch die mit Tamoxifen induzierte Dre-Rekombinase. Somit kommt es zur Expression der mitochondrialen Thioredoxinreduktase, was auch durch  $\beta$ -gal Färbung des Reportergens LacZ oder die zusätzlich eingebrachten FLAG- oder Strep-Tags überprüft werden kann.

Die zeitliche Induzierbarkeit des *knockins* der *Txnrd2* wurde mit der Ligandenbindedomäne ERT2 generiert. Es gibt zwar eine Vielzahl von Ligandenbindedomänen mehrerer unterschiedlicher zytoplasmatischer Hormonrezeptoren, jedoch wurde aufgrund der leichteren oralen Applikation des Inducers Tamoxifen die zweifach mutierte Domäne des Östrogenrezeptors ERT2 verwendet. Ebenso hätte die Möglichkeit bestanden, bereits bestehende ligandenaktivierte Flp-Systeme für die zeitliche Regulation zu nutzen (Logie & Stewart, 1995; Hunter et al., 2005), jedoch erwies sich das Dre/rox-Rekombinationssystem in eukaryotischen Zielzellen effizienter als das Flp/FRT-System (Buchholz et al., 1996; Anastassiadis et al., 2009). Stewart et al. konnten bereits ein ligandeninduzierbares Dre-Progesteronrezeptor Fusionsprotein mit einer gleichwertigen Effizienz zu ligandenaktivierten Cre-Systemen in der Zellkultur erfolgreich einsetzen (Anastassiadis et al., 2009). Das in dieser Arbeit verwendete DreERT2-System ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben, weshalb noch keine Vergleiche auf Rekombinationseffizienz vorliegen.

## **6.2 Klonierung**

Die Klonierung des Targetingvektors pROSA-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ verlief ohne größere Komplikationen. Lediglich die Einklonierung von CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 in den Endvektor pDTA-Hprt musste modifiziert werden, da eine *sticky end* Ligation wegen einer zusätzlichen Schnittstelle nicht möglich war. Diese Schnittstelle, die sich, wie sich nach Einzelverdaus herausstellte, im CAGGs-Promotor befand, war in der zur Verfügung gestellten Sequenzinformation nicht vorhanden. Auch eigene Bemühungen der Sequenzierung scheiterten aufgrund des GC-Reichtums des Promotorbereichs. Nach Änderung der Klonierungsstrategie entstand der Targetingvektor pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 durch Einklonierung mit einem *sticky* und einem *blunt* Ende.

### **6.3 Zielgerichtete Integrationsverfahren (*gene targeting*)**

Für die zielgerichtete Integration wurde in dieser Arbeit ein *gene targeting* durch homologe Rekombination durchgeführt. Dies stellt im Gegensatz zu zufälligen Genomintegrationen ein gerichtetes Verfahren dar, bei dem die Position durch den Austausch von homologen Sequenzbereichen mit einem spezifischen Genlokus vorbestimmt ist. Dadurch werden ungewollte Positionseffekte und Mehrfachintegrationen vermieden.

Daneben gibt es aber auch noch andere Verfahren zur zielgerichteten Integration. Zu diesen gehört z.B. der Rekombinase vermittelte Kassettenaustausch (*recombinase mediated cassette exchange*, RMCE) (Bode et al., 2000; Turan et al., 2011). Dieser besteht aus einem „*double crossover*“, bei dem zuerst der Genort von Interesse durch homologe Rekombination mit heterospezifischen SSR-Erkennungsstellen verändert wird und es dann zu einem Austausch mit dem Transgen, als Kasette flankiert von den gleichen Erkennungssequenzen, durch intermolekulare Rekombination kommt. Voraussetzung dabei ist die Inkompatibilität der verwendeten Erkennungsstellen, z.B. durch Mutagenese von loxP- oder FRT-Sequenzen, um eine Exzision der Kasette zu verhindern. Diese Methode bietet den Vorteil, ein bestimmtes Allel effizient an einem spezifischen Genort gezielt mehrmals austauschen zu können (sog. allelische Serie), stellt aber somit für diese Arbeit aufgrund des einmaligen Integrationsereignisses keine Alternative zum konditionalen *gene targeting* dar.

Daneben gibt es noch zwei andere zielgerichtete Verfahren, das *hit and run*- (Hasty et al., 1991) bzw. *in and out*-Verfahren (Valancius & Smithies, 1991) und das *double replacement*-Verfahren (Stacey et al., 1994; Wu et al., 1994; Moore et al., 1995). Diese werden zur Einfügung von Mutationen ohne störende Resistenzgene genutzt.

Bei der *hit and run*-Methode wird ein Vektor mit entfernt liegenden positiven und negativen Selektionsmarkern erstellt und zunächst durch homologe Rekombination an der gewünschten Stelle integriert (sog. *hit*), wodurch es zu einer Verdopplung der Homologieregion kommt. Durch die positive Selektion werden erfolgreich rekombinierte Zellen erkannt. Es folgt eine intrachromosomale Rekombination zwischen den duplizierten Sequenzen (sog. *run*), bei der es zur Generierung des Ursprungsallels oder des erwünschten mutanten Allels kommt. Dies wiederum kann durch negative Selektion der Zellen bestätigt werden. Vorteil ist dabei die Entfernung

störender Selektionskassetten und Restriktionsschnittstellen, die innerhalb von codierenden oder regulatorischen Abschnitten negativ mit der Expression interferieren könnten. Dies ist in dieser Arbeit aber nicht notwendig, da die Selektionskassette innerhalb der STOP-Kassette liegt und bei erfolgreicher Rekombination der Restriktionsstellen vor der Expression exziiert wird.

Bei dem *double replacement*-Verfahren nutzt man zwei hintereinandergeschaltete *gene targeting* Durchgänge. Zuerst kommt es zu einer internen Deletion des Gens von Interesse durch die Integration eines Platzhalters mit positiven und negativen Selektionsmarkern durch homologe Rekombination. Nach positiver Selektion wird diese markierte Stelle durch einen Targetingvektor, der die gewünschte Mutation beinhaltet, ersetzt und durch negative Selektion bestätigt. Auch dieses Verfahren ist für eine allelische Serie geeignet.

Da in dieser Arbeit jedoch nur jeweils ein Genort einmalig durch Insertion eines Transgens verändert werden sollte, wurden beide Konstrukte durch die gut etablierte homologe Rekombination in das Mausgenom integriert (Smithies et al., 1985; Thomas et al., 1986; Doetschman et al., 1987; Thomas & Capecchi, 1987; Capecchi, 1989b).

#### **6.4 Verwendete Genloci - Strategie und Rekombinationseffizienz**

Als Genloci wurde in dieser Arbeit der Hprt- (Doetschman et al., 1987; Thomas & Capecchi, 1987; Thompson et al., 1989) und ROSA26-Lokus (Soriano, 1999) zur Generierung zweier Mauslinien verwendet. Die gleichzeitige homologe Rekombination beider Targetingkonstrukte in eine ES-Zelle wäre dabei zu ineffizient gewesen, da das Rekombinationsereignis sehr selten ist (in etwa einer von  $10^5$  bis  $10^6$  Zellen, also deutlich  $<1\%$  beträgt (Melton, 2002)) und damit die Wahrscheinlichkeit einer Doppelrekombination extrem gering wäre.

Der ROSA26-Lokus zeichnet sich durch eine hohe Integrationseffizienz aus, wodurch dieser für das *gene targeting* leicht zugänglich ist (Soriano, 1999). In dieser Arbeit wurde eine *gene trap mutagenesis* angewendet, da dieses Verfahren im ROSA26-Lokus bereits erfolgreich durchgeführt wurde (Zambrowicz et al., 1997; Soriano, 1999; Mao et al., 2001; Srinivas et al., 2001). Durch die Anwendung eines promotorlosen Targetingvektors, der nur nach Rekombination hinter dem endogenen ROSA26-Promotor selektierbar ist, ist es möglich, die Anzahl homolog rekombinierter

ES-Zellen nach der Selektion um das >100fache zu erhöhen (Doetschman et al., 1988).

Im Hprt-Lokus ist eine homologe Rekombination von Targetingvektoren mit hoher Effizienz beschrieben (Reid et al., 1991; Bronson et al., 1996). Dieser ist für das *gene targeting* aufgrund der X-chromosomalen Lage und der damit verbundenen Hemizygotie bei Zellen des Karyotyps XY besonders geeignet. Denn damit kann der Lokus selbst als Selektionsmarker für die homologe Rekombination verwendet werden und dient der Verringerung möglicher mutanter Zellklone durch Komplementationsstrategie.

Mit diesen Eigenschaften erwiesen sich der ROSA26-, wie auch der Hprt-Lokus für die homologe Rekombination der beiden Targetingvektoren in dieser Arbeit als geeignet. Dies wird auch durch die Rekombinationseffizienzen bestätigt. So ergab sich für den ROSA26-Lokus eine Rekombinationseffizienz von 1:160 und für den Hprt-Lokus von 1:113. Deng und Capecchi erhielten bei einem >10kb Targetingkonstrukt dagegen eine Rekombinationseffizienz von 1:10<sup>4</sup> und zeigten, dass die Verwendung isogener DNA für die homologe Rekombination eine 10fache Effizienzerhöhung bedingt (Deng & Capecchi, 1992). Dies wird auch von Udy und Mitarbeitern bestätigt, die von Schwankungen der Effizienz der homologen Rekombination abhängig von der Homologie der Targetingsequenz mit der des Genoms der ES-Zellen berichten (Udy et al., 1997). Dabei unterschied sich die Effizienz in R1-Zellen mit 1:189 von denen in E14-Zellen mit 1:1561 mit dem gleichem Targetingvektor. Dabei ist v.a. die Länge der Homologiesequenz von Bedeutung. So zeigten Hasty et al. eine Erhöhung der Rekombinationseffizienz um das 200fache durch Zunahme der Homologiebereiche von 1,3 bis 6,8kb (Hasty et al., 1991).

Die guten Ergebnisse der Rekombinationseffizienz in dieser Arbeit sind dabei wohl einerseits auf die Nutzung großer Homologiebereiche (kurzer Arm: 1132bp (ROSA26) und 3899bp (Hprt), langer Arm: 8785bp (ROSA26) und 4596bp (Hprt)) zurückzuführen, als auch andererseits auf die Ausnutzung der *gene trap mutagenesis* (ROSA26) und Komplementationsstrategie (Hprt).



## **6.5 In vitro Prüfung einzelner Targetingmodule**

### **6.5.1 Reporter gen LacZ**

Über eine transiente Transfektion wurde nach enzymatischer Entfernung der STOP-Kassette das Reporter gen LacZ exprimiert (Cui et al., 1994; Ghim et al., 2010) und damit die Expression von *Txnrd2*-lresLacZ bestätigt. Die Verwendung des Reporter gens LacZ zum Expressionsnachweis in verschiedenen Geweben mittels  $\beta$ -gal Färbung (Burn, 2012) ist seit Langem etabliert (Kruger et al., 1998; Huang et al., 2011; Shimada et al., 2012). Dabei war das Reporter gen LacZ in einem zur Verfügung gestellten Vektor bereits vorhanden und auf Funktionalität geprüft, so dass keine weiteren Umklonierungsmaßnahmen notwendig waren. Das Reporter gen eignet sich besonders zum Expressionsnachweis in gewebsspezifischen konditionalen Systemen und wurde im Hinblick auf den pankreasspezifischen *rescue* der *Txnrd2* gewählt.

Beide Targetingkonstrukte wurden vor der Elektroporation in ES-Zellen in vitro getestet. Dazu waren erneute Umklonierungsmaßnahmen notwendig, die ebenfalls ohne Komplikationen verliefen. Die Umklonierung in den pcDNA6.2-Vektor mit einem stark exprimierenden, prokaryotischen Promotor war für die Expression des ROSA26-Konstrukts unerlässlich, da dieses als Targetingvektor ohne Promotor zur Nutzung der *gene trap mutagenesis* kloniert wurde (Stanford et al., 2001; Friedel & Soriano, 2010). Dabei bietet der Vektor aber zugleich den Vorteil eines enthaltenen EmGFP-Reporters (Tsien, 1998), mit dessen Hilfe die erfolgreiche Transfektion der MIA PaCa2 Zellen während der Kultivierung aufgezeigt werden konnte. Der Nachweis der Rekombination und der nach entfernter STOP-Kassette vorhandenen Expression von *Txnrd2*-lresLacZ erfolgte anschließend mittels  $\beta$ -gal Färbung. Dabei bestand auch die Möglichkeit Spontanrekombinationen in der Zellkultur bei fehlender Rekombinase oder Inducer nachzuweisen und gleichzeitig eine Undichtigkeit der STOP-Kassette (sog. „*leakiness*“) auszuschließen.

### **6.5.2 Transiente Transfektion**

Bei der transienten Transfektion handelt es sich um eine lediglich temporäre Transgenexpression, bei der die Expression vom verwendeten Zelltyp, der Verdopplungszeit der Zellen und dem Transfektionsvektor abhängig ist (Kaufman, 1997; Colosimo et al., 2000). Es ergeben sich Unterschiede zwischen einzelnen Zelllinien in Aufnahmeeffizienz und Expressionsstärke. Somit ist die Funktionalitäts-



prüfung als Vorversuch auf Expressionsprüfung zu werten. Eine fehlende  $\beta$ -gal Färbung und damit eine nicht vorhandene Expression wären ein Hinweis auf funktionslose Konstrukte gewesen. Durch frühzeitiges Erkennen derselben hätte sich die Möglichkeit zur Minimierung des daraus entstehenden Zeitverlustes ergeben.

Nach Bestätigung der Expression des Reportergens als Einheit von *Txnrd2*-IRES-LacZ mittels  $\beta$ -gal Färbung wurden weitere Versuche mit einer stabil generierten Zelllinie unternommen. Somit konnten die anschließenden transienten Transfektionsversuche besser bewertet und miteinander verglichen werden.

### 6.5.3 Spontanrekombination

Bei Prüfung der sogenannten Dichtigkeit, also der Abwesenheit der sog. bekannten „*leakiness*“, der STOP-Kassetten war eine spontane homologe Rekombination von etwa 0,2-0,3% nachweisbar. Dies war unabhängig vom Vorhandensein einer Rekombinase oder eines Inducers.

Eine spontane homologe Rekombination von  $1 \times 10^{-5}$  Ereignissen pro Zellgeneration wurde bei Zellkulturversuchen mit einem FRT flankierten LacZ-Reportergen nachgewiesen, wobei die homologe Rekombination als *crossover* Ereignisse entweder durch intrachromosomalen „*popout*“ oder durch Schwesterchromatid-Austausch unabhängig vom Vorhandensein von Rekombinasen zustande kam (Ludwig & Stringer, 1994).

In einer Arbeit über den Rekombinationsmechanismus zeigte sich in transgenen Drosophila-Zelllinien eine Rate von spontanen homologen Rekombinationen von ungefähr 0,03% (Bärtsch, 1997), indem die Zellen entweder einen G418 resistenten oder LacZ positiven Phänotyp aufwiesen. Die Gabe mutagener Substanzen, die Reduktion von Serum, wie auch eine Behandlung der Zellen mit Mytomycin C erhöhten die Rekombinationsrate dabei zusätzlich.

Bei Abwesenheit des Inducers kann es in Form eines „*leakage effects*“ zu einer Hintergrundrekombination durch die Rekombinase kommen. Diese sog. „*leakiness*“ ist vermutlich auf eine Proteolyse des Fusionsproteins mit Freisetzung geringer Mengen aktiver Rekombinase zurückzuführen, wodurch eine Exzision ermöglicht wird (Birling et al., 2009).

Spontanrekombinationen kommen in Abwesenheit von Rekombinasen und Inducers vor und spiegeln somit keine fehlerhafte undichte STOP-Kassette wieder.

Für die geplanten Experimente in Mausmodellen spielt die beobachtete geringe *leakiness* keine Rolle.

#### 6.5.4 Rekombinationseffizienz in vitro

Eine 100%ige Rekombination ist auch nach Zugabe der Dre-Rekombinase unter Applikation von 4-Hydroxytamoxifen in vitro nicht gegeben. Auch dies wird in verschiedenen Untersuchungen bestätigt, bei denen Rekombinationseffizienzen von bis zu 80% nach Induktion beschrieben werden (Brocard et al., 1997; Schwenk et al., 1998; Vasioukhin et al., 1999). Dies wird entweder auf eine nicht ausreichende Expression der Rekombinase oder aber auf eine unzureichende intrazelluläre Tamoxifenmenge zurückgeführt (Birling et al., 2009).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Rekombinationseffizienzen in vitro bewegen sich zwischen 70 und 80% und spiegeln damit die in der Literatur beschriebenen Werte wieder.

Für die geplanten Experimente sind die Rekombinationseffizienzen ausreichend.

#### 6.5.5 Western Blot

Zur Verifizierung der Expression von transgenen TXNRD2, wie auch zur Bestätigung des FLAG Tags wurde ein Western Blot mit isoliertem Protein aus der stabilen Zelllinie durchgeführt. Nur die stabilen Zelllinien SZL\_17 und SZL\_30 zeigten im Western Blot eine starke Überexpression von TXNRD2, obwohl die anderen verwendeten Zelllinien sich in der Zellkultur ebenfalls als  $\beta$ -gal positiv nach erfolgter Selektion erwiesen. Das ist ein erwartetes Ergebnis, denn durch zufällige Integration der Plasmid-DNA ins Genom können sich die Zelllinien zum Teil erheblich in ihrer Expression aufgrund sog. Positionseffekte durch die chromosomale Umgebung (Baubonis & Sauer, 1993), wie auch durch unterschiedliche Kopienzahl des eingeführten Transgens in sog. *multicopy arrays* unterscheiden (Garrick et al., 1998). Es kann sogar ein „*gene silencing*“ zustande kommen (Martin & Whitelaw, 1996; Garrick et al., 1998).

Die erhaltenen in vitro Ergebnisse, in denen – soweit möglich - alle Module getestet wurde, lassen den Schluss zu, dass die Module funktional in die Targetingkonstrukte integriert wurden. Deshalb wurde als nächster Schritt eine Elektroporation der Targetingvektoren in ES-Zellen durchgeführt.

## **6.6 Elektroporation in ES-Zellen**

Nach der in vitro Testung wurden die Targetingvektoren mittels enzymatischen Restriktionsverdau linearisiert und anschließend in männliche IDG3.2 ES-Zellen ((C57BL/6J x 129S6/SvEvTac) F1) elektroporiert.

Diese Zelllinie wurde aus zwei Gründen gewählt. Zum einen besitzt sie bereits einen 50%igen C57BL/6 Hintergrund, so dass die Rückkreuzung auf diesen genetischen Hintergrund verkürzt wird. Zum anderen ist das Verwenden einer ES-Zelllinie mit einem XY Karyotyp eine Notwendigkeit, wenn man die Komplementationstechnik zur Selektion verwenden will, aufgrund der Tatsache, dass der Hprt-Lokus X-chromosomal lokalisiert ist und damit ein *rescue* des getargeteten X-Chromosoms durch die Weitervererbung eines zweiten, ungetargeteten X-Chromosoms mit Verlust des Transgens durch den Einsatz einer männlichen ES-Zelllinie verhindert wird.

Die Literatur zeigt, dass es einige Vorteile von reinen C57BL/6 ES-Zellen im Gegensatz zu den gängigen ES-Zellen aus 129 Unterstämmen gibt. Aufgrund schlechter Zuchterfolge (Seong et al., 2004) wie auch genetischer und phänotypischer Varianz der 129 Unterstämme (Simpson et al., 1997; Linder, 2001, 2006), bei der die genetisch veränderten Nachkommen abnormale(s) Immunologie (Mcvicar et al., 2002) und Verhalten (Crawley et al., 1997) aufweisen, werden diese üblicherweise mit C57BL/6 rückgekreuzt, um phänotypisch vergleichbare Analysen und verbesserte Fertilität zu ermöglichen (Seong et al., 2004). Für die dazu nötigen 10 Generationen ist eine Zeitspanne von mindestens drei Jahren einzuplanen.

Nachteilig bei der C57BL/6 ES-Zelllinie ist dagegen die schwierigere Kultivierung in vitro. So vermehren sich die Zellen mit einer Verdopplungszeit von 24 Stunden langsamer als 129 ES-Zellen mit 18 Stunden. Dabei benötigen sie aufwendigere Kultivierungsbedingungen, indem sie auf feederhaltigen Zellkulturplatten mit zusätzlich zugesetztem LIF angezüchtet werden, um einen Verlust der Keimbahnfähigkeit zu verhindern (Auerbach et al., 2000; Ware et al., 2003). Die Verwendung einer F1-ES-Zelllinie aus C57BL/6x129 bietet den Vorteil einer genetisch und phänotypisch stabilen Linie ohne Notwendigkeit für langwierige Rückkreuzungen oder Keimbahnverlust. Da die Linie bereits erfolgreich eingesetzt wurde und sich als männliche ES-Zelllinie für die Komplementationsstrategie ebenfalls eignete, wurde sie in dieser Arbeit verwendet.

### **6.7 Screening-Verfahren der ES-Zellklone**

Der Nachweis korrekt integrierter ROSA26-Klone erfolgte mittels PCR und quantitativer *real-time* PCR (TaqMan). Bei Letzteren werden als Standard zur relativen Quantifizierung Referenzgene, in diesem Fall  $\beta$ -Aktin, durch das Verhältnis der ct-Werte des Referenzgens zu denen von neo verwendet. Da  $\beta$ -Aktin bereits in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten verwendet wurde (Bustin, 2000; Mori et al., 2008), wurde es auch in dieser Arbeit als Standard ausgewählt. Um versuchsbedingte Variationen auszuschließen, wurde die Menge an  $\beta$ -Aktin zwischen Test- und Kontrollgruppen auf signifikante Abweichungen überprüft und dabei sichergestellt, dass die gemessenen ct-Werte des Referenzgens in allen untersuchten Proben nicht um mehr als  $\pm 1,5$  vom mittleren  $\beta$ -Aktin ct-Wert abweichen.

Die korrekte, einmalige Integration der Hprt-Klone wurde dagegen mittels Southern Blot nachgewiesen. Dabei war die Qualität der Southern Blots jedoch niedrig und damit schwer beurteilbar, so dass mehrere Durchläufe durchgeführt wurden. Die Ergebnisse konnten auch nach mehreren Durchgängen mit Variation der Expositionszeit und Aufreinigung der Sonden nach Gelelution mittels Säulchen nicht verbessert werden. Ebenso erwies sich eine Überprüfung des Hprt-Lokus wie im Falle der ROSA26-Strategie mittels PCR und TaqMan aufgrund des GC-Reichtums des CAGGs-Promotors als schwierig. Deshalb ist der nächste Schritt nun eine Prüfung der Funktionalität des Transgens *in vivo* und die Expressionsprüfung von DreERT2 mittels Western Blot.

### **6.8 Selektion der ES-Zellen**

Die Selektion der ES-Zellen erfolgte für die beiden Mauslinien durch Verwendung einer Positiv-Negativ-Selektion mit den Selektionsmarkern neo und DTA. Diese wurde bereits mehrmals in der Literatur als effizient beschrieben (McCarrick et al., 1993; Yanagawa et al., 1999). Dabei lässt sich der Anteil der homologen rekombinanten Zellklone durch die Kombination eines positiven mit einem außerhalb der homologen Bereiche gelegenen negativen Selektionsmarkers um das 10- bis 1000-fache erhöhen (Mansour et al., 1988; Valancius & Smithies, 1991).

Bei den Hprt ES-Zellen wurde nach zweiwöchiger Selektion mit G418 noch eine Selektion mit 6-TG durchgeführt. Der große Nachteil von Doppelselektionen besteht dabei in der hohen Passagenzahl der manipulierten ES-Zellen durch die zweite

Selektionsrunde, wodurch die Anzahl der ES-Zellklone abnimmt, die in den entsprechend erstellten Chimären das Potential zur Besiedlung der Keimbahn zeigen (Fedorov et al., 1997; Longo et al., 1997). Da die ES-Zellen der Hprt-Linie jedoch noch nicht injiziert und transferiert wurden, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschätzt werden, inwiefern die doppelte Selektion und die dadurch höhere Passagenzahl der Entwicklung keimbahngängiger Chimären geschadet hat. Dies kann im späteren Vergleich zu der ROSA26-Linie, von der bereits keimbahngängige Chimären vorhanden sind, ermittelt werden.

### **6.9 Blastozysteninjektion**

Als transgen bestätigte ES-Zellklone der ROSA26-Linie wurden in dieser Arbeit in BDF1-Blastozysten injiziert und anschließend in pseudogravide Rezipienten transferiert. Dabei mussten die daraus entstandenen Chimären erst auf Transgenität untersucht und anschließend auf Keimbahntransmission via Rückkreuzung getestet werden.

Es wurden bereits Methoden etabliert, um die zeitaufwändigen Schritte der Chimärenerzeugung und Verpaarung zu umgehen. Eine Möglichkeit ist die Erzeugung 100%-iger Chimären durch die Verwendung tetraploider Blastozysten (Wang et al., 1997; Misra et al., 2001). Die in dieser Arbeit verwendeten Blastozysten sind diploid und tragen zur Embryonalanlage bei. Im Gegensatz dazu bilden tetraploide Zellen nur extraembryonales Gewebe, wie die Plazenta, nicht aber embryonales Gewebe (Nagy et al., 1990). So können bei Verwendung von tetraploiden Blastozysten nach Injektion mit diploiden ES-Zellen komplett aus ES-Zellen abstammende Tiere erhalten werden. Die tetraploiden Blastozysten werden meist nach Elektrofusion diploider Zweizellembryonen mit anschließender Kultivierung bis zum Blastozystenstadium erzeugt (Kaufman & Webb, 1990). Für diese Arbeit hätte diese zeitsparende Methodik eine gute Alternative zur Chimärenerzeugung dargestellt. Bei einem solchen Ansatz konnte ebenfalls gezeigt werden, dass verwendete F1-Hybrid ES-Zellen eine höhere Effizienz als übliche Inzucht ES-Zellen aufweisen (Nagy et al., 1993; Eggan et al., 2001). Damit hätte die Möglichkeit bestanden die zum jetzigen Zeitpunkt erst als ES-Zellen vorliegende Hprt-Linie zu injizieren und zu transferieren und damit in kürzerer Zeit die induzierbare, pankreasspezifische *knockin*-Linie zu generieren.

Jedoch gibt es in der Literatur keinen Hinweis auf die Injektion von IDG3.2 ES-Zellen in tetraploide Embryonen und damit auf Lebensfähigkeit der erzeugten Tiere.

### **6.10 Chimärismus und Keimbahntransmissivität**

Es zeigte sich im Vergleich von 129 und C57BL/6 ES-Zellen, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Targetingeffizienz, also dem Anteil der nach Doppelselektion vorhandenen positiven ES-Zellklone, der Chimärenrate wie auch der männlichen Chimärenrate gibt (Keskintepe et al., 2007). Die Chimärenrate betrug in der Literatur zwischen 23% (Ware et al., 2003) und 32,7% (Keskintepe et al., 2007), wobei darauf verwiesen wird, dass nicht nur die ES-Zelllinie, sondern auch andere Parameter wie Abstammung und Qualität der Blastozysten und die Mikroinjektion eine entscheidende Rolle spielen (Keskintepe et al., 2007). So konnten von vier unterschiedlichen C57BL/6 ES-Zelllinien Raten zwischen 12 und 43% erzielt werden (Kawase et al., 1994). Die Rate der männlichen Chimären lag hingegen zwischen 77% (Keskintepe et al., 2007) und 81% (Ware et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Chimärenrate von 42% erreicht, wobei 87,5% der Chimären männlich waren. Dabei weist eine hohe männliche Chimärenrate auf ein hohes Keimbahnpotential einer ES-Zelllinie hin, da bei einem XY-Karyotyp kein genetischer *rescue* durch ein zweites X-Chromosom erfolgen kann.

In dieser Arbeit wurden die homologen Bereiche nicht selbst generiert. Diese wiesen im Falle des R26-Lokus einen 129- und im Falle des Hprt-Lokus einen C57BL/6-Hintergrund auf, so dass die F1-Hybrid-ES-Zelllinie aus C57BL/6J und 129S6/SvEvTac gewählt wurde. Somit konnte die Targetingeffizienz der homologen Rekombination durch die Verwendung semi-isogener (R26-Lokus) und isogener (Hprt-Lokus) Sequenzen erhöht werden (Te Riele et al., 1992; Keskintepe et al., 2007). Dennoch ist es ein zeitaufwändiges Verfahren, bei dem nach Transfer der injizierten Blastozysten in CD1-Rezipienten die entstandenen Chimären erst durch Rückkreuzung auf Keimbahngängigkeit getestet und die folgende F1-Generation per PCR genotypisiert werden müssen.

### **6.11 Funktioneller Test der ROSA26 Maus**

Aufgrund der in vitro Versuche, bei denen alle überprüfbaren Module (Dichtigkeit der STOP-Kassetten, Rekombinationseffizienz von Cre/Dre auf loxP/rox, Expression von *Txnrd2*-IresLacZ und Effizienz von DreERT2) auf Funktion bestätigt wurden, kann man darauf schließen, dass auch die Funktionalität der klonierten Konstrukte in vivo gegeben ist.

In vivo konnte die Funktionalität der ROSA26-Mauslinie durch  $\beta$ -gal Färbung von Embryonen aus der Verpaarung von ROSA26-F1 Tieren mit einer ubiquitären Dre-deleter Mauslinie (Anastassiadis et al., 2009) bestätigt werden. Dabei zeigten Embryonen, die zwar das ROSA26-Transgen, jedoch nicht die Dre-Bande in der Genotypisierung aufwiesen, keinerlei Spontanrekombination und bestätigten damit die Dichtigkeit der STOP-Kassette von ROSA26 in vivo. Tiere mit dem Transgen und der Rekombinase zeigten die ubiquitäre Expression von *Txnrd2*-IresLacZ dagegen durch eine Blaufärbung aller Gewebe. Zur Abklärung, ob die mitochondriale Thioredoxinreduktase auch funktionsfähig ist, wird im Anschluss an diese Arbeit ein Aktivitätsassay erfolgen. Dies wurde bereits in Zellkultur versucht (Daten nicht gezeigt), aber aufgrund niedriger Proteinmengen konnte noch keine Funktionalität der TXNRD2 verifiziert werden. Da Selenoproteine generell kaum überexprimiert werden können, ist es auch schwierig die zusätzliche transgene Expression von der vorhandenen endogenen Expression zu unterscheiden.

Da ein derartiges *knockin*-Modell mit gewebsspezifischer und induzierbarer Kombination der Rekombinationssysteme Cre/loxP und Dre/rox in der Literatur bis dato noch nicht beschrieben ist, kann noch kein Vergleich zu anderen Modellen gezogen werden.

Bisher ist es jedoch möglich, die Ergebnisse von Sauer und McDermott, wie auch von Stewart et al. bezüglich einer voneinander unabhängigen, hohen Rekombinationseffizienz in vitro zu bestätigen (Sauer & McDermott, 2004; Anastassiadis et al., 2009). Ebenso erwies sich die Dre-Rekombinase gekoppelt an die Ligandenbindedomäne ERT2 in der Zellkultur als funktionsfähig. Dies konnte von Stewart und Mitarbeitern in einem Progesteroninduzierbaren System ebenfalls verifiziert werden (Anastassiadis et al., 2009).



## 6.12 Ausblick

Ein Tiermodell, das durch Kreuzung einer pankreasspezifischen Cre-rekombinanten Linie mit einer *Txnrd2*-geflochten Mauslinie generiert wurde, wird derzeit umfassend untersucht. Für den genetischen *rescue* dieses *knockout*-Modells wurden zwei Konstrukte kloniert und in das Mausgenom eingebracht. Die in dieser Arbeit generierte ROSA26-Linie (pROSA26-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ) zur Expression von *Txnrd2* liegt bereits als homozygote F2-Generation vor (ROSA-rsr-*Txnrd2*<sup>tg/tg</sup>). In Kürze wird mit der Kreuzung der *knockout*- und der ROSA26-Linie begonnen. Ziel ist es, Tiere zu erhalten, die homozygot für das geflochte *Txnrd2* sind mit homozygot verändertem ROSA26-Lokus bei heterozygoter Anwesenheit der durch den Ptf1a-Promotor getriebenen Cre-Rekombinase (*Txnrd2*<sup>fl/fl</sup>; Ptf1a-Cre<sup>tg/wt</sup>; ROSA-rsr-*Txnrd2*<sup>tg/tg</sup>). Die bereits erstellten ES-Zellklone für die Hprt-Linie (pHprt-loxSTOPlox-DreERT2) werden im Anschluss an diese Arbeit in Blastozysten injiziert und transferiert. Nach Testung auf Keimbahntransmission der Hprt-Chimären werden die heterozygoten F1-Nachkommen (Hprt-lsl-DreERT2<sup>tg/wt</sup>) mit Mäusen des Genotyps *Txnrd2*<sup>fl/fl</sup>; Ptf1a-Cre<sup>tg/wt</sup>; ROSA-rsr-*Txnrd2*<sup>tg/tg</sup> gekreuzt. Dadurch erhält man aus vier einzelnen transgenen Mauslinien eine induzierbare, pankreasspezifische *Txnrd2*-*knockin* Mauslinie (*Txnrd2*<sup>fl/fl</sup>; Ptf1a-Cre<sup>tg/wt</sup>; ROSA-rsr-*Txnrd2*<sup>tg/tg</sup>; Hprt-lsl-DreERT2<sup>tg/wt</sup>) (Abbildung 4). Bei dieser besteht dann die Möglichkeit, den *knockin* der mitochondrialen Thioredoxinreduktase zu verschiedenen Zeitpunkten zu induzieren und den pankreasspezifischen Phänotyp auf mögliche Veränderungen zu untersuchen.

Damit wurde ein Modell erstellt, das eine breite Anwendung und vielfältige Einsatzmöglichkeiten bietet. So kann ein genetischer *rescue* eines *Txnrd2*-*knockouts* in den unterschiedlichsten Geweben erfolgen. Denn durch die große Anzahl bereits verfügbarer gewebsspezifischer Cre-rekombinanter Mauslinien besteht die Möglichkeit, in verschiedenen Organsystemen durch Kreuzung einer variablen gewebsspezifischen Cre-Mauslinie mit der bereits vorhandenen geflochten *Txnrd2*-Mauslinie einen *Txnrd2*-*knockout* in jedem beliebigen Organsystem zu generieren. Dessen *Txnrd2*-*rescue* erfolgt durch das in dieser Arbeit klonierte System. Somit wird die Untersuchung der *Txnrd2*-Funktion und deren Beteiligung an Krankheitsprozessen in unterschiedlichsten Geweben ermöglicht.

Darüber hinaus kann dieses Transgenmodell aber auch auf alle anderen konditionalen *knockout*-Systeme unter dem Einfluß eines gewebsspezifischen Promotors erweitert werden. Dabei ist die pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 Linie unverändert anwendbar. Lediglich ist eine Umklonierung des pROSA-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ Targetingvektors durch den Austausch der mitochondrialen Thioredoxinreduktase mit dem Gen von Interesse erforderlich. Somit ergibt sich für dieses System eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten in Form eines genetischen *rescue* aller gewünschter Gene, der in den verschiedensten Geweben durchgeführt werden kann.

Aber auch eine Kombination der Rekombinationssysteme Flp/FRT, Cre/loxP und Dre/rox wäre denkbar. So könnte in einem einzigen Tiermodell durch Verwendung unterschiedlicher induzierbarer Ligandenbindedomänen in einem gewebsspezifischen *knockout* ein genetischer *rescue* zweier Gene zum selben oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten getestet werden. Durch diese Strategie ist es möglich den Einfluss der Genexpressionen unterschiedlicher Gene auf einen *knockout*-Phänotyp und die eventuell auftretende Potenzierung der Expressionswirkung zweier Gene auf diesen zu untersuchen.

## 7 Zusammenfassung

Die mitochondriale Thioredoxinreduktase (*Txnrd2*) stellt als ubiquitär exprimiertes Selenoprotein ein wichtiges redox-aktives Enzymsystem zum Schutz vor oxidativem Stress dar. In einem *Txnrd2*-defizienten Mausmodell stellte sich eine embryonale Letalität am Tag E13.0 heraus. Hingegen zeigte sich in einem pankreasspezifischen *Txnrd2*-*knockout* ab der vierten Woche post partum eine spontan entstehende Pankreaserkrankung, die sich innerhalb eines Jahres zu einer fibrotischen exokrinen Pankreashypotrophie entwickelte. Dieses pankreasspezifische Modell, das durch Kreuzung einer Ptf1a-Cre transgenen Linie mit einer Mauslinie, deren *Txnrd2* von loxP Sequenzen flankiert ist, generiert wurde, wird derzeit umfassend untersucht. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Generierung und Testung zweier Targetingvektoren zur Etablierung eines Mausmodells, das die Überexpression der murinen *Txnrd2* in unterschiedlichen Organsystemen erlaubt. Dies geschieht im Hinblick auf die Generierung eines genetischen *rescue* des *Txnrd2*-Phänotyps im bestehenden pankreasspezifischen *knockout*-Modell zur Klärung der Fragestellung, ob durch das Wiedereinschalten der *Txnrd2* Veränderungen oder gar eine Reversibilität des beobachteten Phänotyps möglich sind.

Zur Etablierung des *rescue* wurde eine konditionale Komplementationsstrategie aus den Rekombinationssystemen Cre/loxP und Dre/rox gewählt. Zwei Targetingvektoren pROSA-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ und pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 wurden kloniert. Durch die Kombination beider Konstrukte mit dem zuvor erwähnten pankreasspezifischen *knockout* katalysiert Cre die Rekombination des geflochtenen *Txnrd2*-Allels sowie der loxSTOPlox-Kassette vor DreERT2 im Pankreas während der Embryonalentwicklung. So erfolgt zeitgleich mit der *knockout*-Induktion die DreERT2-Expression. Jedoch erfolgt die DreERT2-Aktivierung erst nach Tamoxifengabe. Das aktivierte Dre rekombiniert die roxSTOPprox-Kassette vor der *Txnrd2*-IresLacZ Sequenz im ROSA26-Lokus und ermöglicht somit die Expression des transgenen *Txnrd2* zu jedem beliebigen Zeitpunkt. Nach der erfolgreichen Etablierung beider Targetingvektoren wurden ihre einzelnen Module vor dem Einbringen in die murine Keimbahn in vitro getestet. In Zellkulturexperimenten konnte die *Txnrd2*-Expression durch Tamoxifen-induziertes Dre bestätigt werden. Der Nachweis der Proteinexpression von transgenem TXNRD2 erfolgte im Western Blot. Nach Bestätigung der Funktionalität beider Konstrukte wurden diese in IDG3.2 ES-Zellen

elektroporiert. Für die Integration durch homologe Rekombination wurden die Genloci ROSA26 und Hprt des Mausgenoms gewählt, da bekannt ist, dass diese leicht zugänglich sind und ubiquitär exprimieren. Zur Erhöhung der Rekombinations-effizienz wurden eine *gene trap mutagenesis* (ROSA26) und eine Komplementationsstrategie (Hprt) verwendet. Anschließend erfolgte die Überprüfung auf korrekte Integration via PCR und quantitativer *real-time* PCR (ROSA26) bzw. Southern Blot (Hprt). Heterozygot transgene Zellklone der ROSA26-Linie wurden in BDF1-Blastozysten injiziert und diese in pseudogravide CD1-Rezipienten transferiert. Durch Rückkreuzung mit C57BL/6N-Wildtypmäusen wurden die Chimären auf Keimbahntransmission überprüft. Daraus hervorgegangene heterozygot transgene F1-Nachkommen wurden mit einer sogenannten Dre-deleter Mauslinie, die ubiquitär die Dre-Rekombinase exprimiert, verpaart. Dabei konnte bei E14.5 alten Embryonen eine ubiquitäre Expression von LacZ nachgewiesen werden, was die in vivo Funktionalität der generierten pROSA-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ-Linie bestätigte. Die Generierung von Hprt-Chimären steht noch aus.

Das erstellte Modell bietet die Möglichkeit des genetischen *rescue* von einem *Txnrd2-knockout* durch die Expression von transgenem *Txnrd2*. Dabei ist dieses System nicht auf die Anwendung im Pankreas beschränkt und durch den variablen Einsatz verschiedener gewebspezifischer Cre-transgener Linien auf unterschiedliche Organsysteme übertragbar. Darüber hinaus kann dieses Transgenmodell aber auch auf alle anderen konditionalen *knockout*-Systeme unter dem Einfluß eines gewebspezifischen Promotors angewandt werden. Die Anwendung der Hprt-Mauslinie bleibt dabei unverändert, lediglich eine Umklonierung des pROSA-roxSTOProx-*Txnrd2*-IresLacZ Targetingvektors durch den Austausch der mitochondrialen Thioredoxinreduktase mit dem Gen von Interesse und die Erzeugung der entsprechenden transgenen Mauslinie ist dafür erforderlich. Durch die Kombination der Rekombinationssysteme FLP/Frt, Cre/loxP und Dre/rox ließen sich zusätzlich Studien erstellen, bei denen unterschiedliche Gene gleichzeitig oder nacheinander in einem gewebspezifischen *knockout* induziert werden könnten. Durch diese Strategien wäre der Einfluss der Genexpression auf einen *knockout*-Phänotyp in verschiedenen Organsystemen und die eventuell auftretende Potenzierung der Expressionswirkung zweier verschiedener Gene auf diesen untersuchbar.

Diese Arbeit ergänzt die “toolbox” für die genetische Modellierung von Krankheitsmodellen in der Maus um ein zusätzliches sehr nützliches Werkzeug.

## 8 Summary

### **Combination of the Cre/loxP and Dre/rox recombination systems for the genetic rescue in knockout mouse models using the example of the mitochondrial thioredoxin reductase**

The mitochondrial thioredoxin reductase (*Txnrd2*) is an ubiquitously expressed selenoprotein and an important oxidoreductase regulating oxidative stress. Ubiquitous deletion of *Txnrd2* turned out to be embryonic lethal at day E13.0, while its pancreas-specific knockout caused spontaneous pancreas disease starting at week four post partum that developed into an exocrine fibrotic pancreas hypotrophy within one year. This pancreas-specific model, generated by breeding a Ptf1a-Cre transgenic line and a mouse line in which *Txnrd2* is flanked by loxP sites is thoroughly examined at the moment. The present study aimed at the generation and testing of two targeting vectors for the establishment of a mouse model that allows the overexpression of the murine *Txnrd2* in different organ systems. This took place in view of the generation of a genetic rescue of the *Txnrd2* phenotype within the existing pancreas-specific knockout model, in order to clarify the question if it is possible to observe changes or the reversibility of the phenotype by *Txnrd2*-knockin.

For the establishment of the rescue a conditional complementation strategy using the recombination systems Cre/loxP and Dre/rox was chosen. Two targeting constructs pROSA-roxSTOProx-*Txnrd2*-lresLacZ and pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 were cloned. When combining those two constructs within the above mentioned pancreas-specific knockout, Cre catalyzes the recombination of the floxed *Txnrd2* allele and at the same time of the loxSTOPlox cassette in front of DreERT2 in the pancreas during embryonic development. So that at the same time when the knockout is induced, DreERT2 is also expressed. However DreERT2 is only activated after Tamoxifen administration. The activated Dre recombines the roxSTOProx-cassette in front of the *Txnrd2*-lresLacZ sequence within the ROSA26 locus and thus enables the expression of transgenic *Txnrd2* at a given time point. After the successful generation of both targeting vectors their singular modules were tested in vitro before integrating them into the murine germline. In cell culture experiments *Txnrd2*-expression by Tamoxifen-induced Dre was confirmed. Protein expression of transgenic TXNRD2 at the same time was proven in Western Blot. As

the full functionality of both constructs was confirmed they were electroporated in IDG3.2 ES cells. For the following integration by homologous recombination the gene loci ROSA26 and Hprt of the mouse genome were chosen, as it is well-known that they can be targeted with high efficiency and that they are expressed ubiquitously. In order to increase the recombination efficiency a gene trap mutagenesis (ROSA26) and a complementation strategy (Hprt) were used. Following this, screening for correct integration was done by PCR and quantitative real-time PCR (ROSA26) or alternatively by Southern Blot (Hprt). Heterozygous transgenic cell clones of the ROSA26 line were injected into BDF1-blastocysts and transferred in pseudopregnant CD1 recipients. By backcrossing with C57BL/6N wild-type mice chimeras were tested for germline transmission. The resulting heterozygous transgenic F1 offspring was crossed with a so called Dre-deleter mouse ubiquitously expressing Dre-recombinase. Thereby the ubiquitous expression of LacZ was proven in E14.5 old embryos which confirmed the in vivo functionality of the generated pROSA-roxSTOProx-*Txnrd2*-lresLacZ-line. The generation of Hprt chimeras remains to be done.

This model offers the opportunity of the genetic rescue of a *Txnrd2*-knockout by expressing the transgenic *Txnrd2*. This system is not restricted to the pancreas, as different organ systems can be targeted by the variable application of diverse tissue specific Cre-transgenic lines. Furthermore the transgenic model can be used for all other conditional knockout-systems under the influence of any tissue specific promoter. The application of the Hprt mouse line remains unchanged, all that has to be done is the exchange of the mitochondrial thioredoxin reductase by the gene of interest via cloning and the generation of the respective mouse line. The combination of the recombination systems FLP/Frt, Cre/loxP and Dre/rox enables further studies in which different genes can be induced at the same time or one by one in a tissue-specific knockout. This strategy enables to investigate the influence of gene expression on a knockout phenotype in different organ systems and also the possibly occurring potentiation of the expression of two different genes.

This thesis adds one further very useful tool to the toolbox for genetic modeling of murine disease models.



## 9 Literaturverzeichnis

- Abremski K, Hoess R, Sternberg N. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 1983; 32: 1301-11.
- Aichler MY (2007) Influence of selenium on pancreatic carcinogenesis and the role of the selenoproteins cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in the pancreas. In: Abteilung für Vergleichende Medizin, Helmholtz Zentrum München und Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaften. Universität Hohenheim.
- Alexander J. Selenium. *Novartis Found Symp* 2007; 282: 143-9; discussion 9-53, 212-8.
- Almondes KG, Leal GV, Cozzolino SM, Philippi ST, Rondo PH. The role of selenoproteins in cancer. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56: 484-8.
- Anastassiadis K, Fu J, Patsch C, Hu S, Weidlich S, Duerschke K, Buchholz F, Edenhofer F, Stewart AF. Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in *E. coli*, mammalian cells and mice. *Dis Model Mech* 2009; 2: 508-15.
- Anastassiadis K, Glaser S, Kranz A, Berhardt K, Stewart AF. A practical summary of site-specific recombination, conditional mutagenesis, and tamoxifen induction of CreERT2. *Methods Enzymol* 2010; 477: 109-23.
- Araki K, Araki M, Yamamura K. Negative selection with the Diphtheria toxin A fragment gene improves frequency of Cre-mediated cassette exchange in ES cells. *J Biochem* 2006; 140: 793-8.
- Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6102-9.
- Arner ES. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 495-526.
- Auerbach W, Dunmore JH, Fairchild-Huntress V, Fang Q, Auerbach AB, Huszar D, Joyner AL. Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-derived mouse embryonic stem cell lines. *Biotechniques* 2000; 29: 1024-8, 30, 32.
- Austin S, Ziese M, Sternberg N. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 1981; 25: 729-36.

- Barceloux DG. Selenium. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999; 37: 145-72.
- Bärtsch S (1997) Development of transgene *Drosophila melanogaster* models for studying in vivo and in vitro homologous recombination between duplicated alleles. ETH Zürich.
- Baubonis W, Sauer B. Genomic targeting with purified Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 2025-9.
- Beck MA, Levander OA, Handy J. Selenium deficiency and viral infection. *J Nutr* 2003; 133: 1463S-7S.
- Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG. Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev* 1997; 11: 1-10.
- Beres TM, Masui T, Swift GH, Shi L, Henke RM, MacDonald RJ. PTF1 is an organ-specific and Notch-independent basic helix-loop-helix complex containing the mammalian Suppressor of Hairless (RBP-J) or its paralogue, RBP-L. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 117-30.
- Birling MC, Gofflot F, Warot X. Site-specific recombinases for manipulation of the mouse genome. *Methods Mol Biol* 2009; 561: 245-63.
- Biterova EI, Turanov AA, Gladyshev VN, Barycki JJ. Crystal structures of oxidized and reduced mitochondrial thioredoxin reductase provide molecular details of the reaction mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 15018-23.
- BMELV.[http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/2010-TierversuchszahlenGesamt.pdf;jsessionid=FB1E733BDE38625A2F2244655B2A57DD.2\\_cid288?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/2010-TierversuchszahlenGesamt.pdf;jsessionid=FB1E733BDE38625A2F2244655B2A57DD.2_cid288?__blob=publicationFile); 08.07.2012.
- Bock A, Forchhammer K, Heider J, Leinfelder W, Sawers G, Veprek B, Zinoni F. Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol Microbiol* 1991; 5: 515-20.
- Bode J, Schlake T, Iber M, Schubeler D, Seibler J, Snezhkov E, Nikolaev L. The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol Chem* 2000; 381: 801-13.
- Bonnerot C, Rocancourt D, Briand P, Grimber G, Nicolas JF. A beta-galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 6795-9.

- Bosl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo MM. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 5531-4.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984; 309: 255-6.
- Bradley A, Ramirez-Solis R, Zheng H, Hasty P, Davis A. Genetic manipulation of the mouse via gene targeting in embryonic stem cells. *Ciba Found Symp* 1992; 165: 256-69; discussion 69-76.
- Branda CS, Dymecki SM. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 2004; 6: 7-28.
- Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL, Chambon P, Metzger D. Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 14559-63.
- Brocard J, Feil R, Chambon P, Metzger D. A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 4086-90.
- Bronson SK, Plaehn EG, Kluckman KD, Hagaman JR, Maeda N, Smithies O. Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9067-72.
- Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr* 2001; 4: 593-9.
- Buchholz F, Ringrose L, Angrand PO, Rossi F, Stewart AF. Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 4256-62.
- Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 657-62.
- Burke MP, Opeskin K. Fulminant heart failure due to selenium deficiency cardiomyopathy (Keshan disease). *Med Sci Law* 2002; 42: 10-3.

- Burn SF. Detection of beta-galactosidase activity: X-gal staining. *Methods Mol Biol* 2012; 886: 241-50.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-93.
- Cao Y, Hayes F. A newly identified, essential catalytic residue in a critical secondary structure element in the integrase family of site-specific recombinases is conserved in a similar element in eucaryotic type IB topoisomerases. *J Mol Biol* 1999; 289: 517-27.
- Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 1989a; 5: 70-6.
- Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989b; 244: 1288-92.
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 8790-4.
- Caskey CT, Kruh GD. The HPRT locus. *Cell* 1979; 16: 1-9.
- Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J* 1986; 5: 1221-7.
- Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, Novelli G, Malone RW, Bennett MJ, Gruenert DC. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques* 2000; 29: 314-8, 20-2, 24 passim.
- Combs GF, Jr., Gray WP. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther* 1998; 79: 179-92.
- Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, Schmahl W, Chien KR, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9414-23.
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 132: 107-24.

- Cui C, Wani MA, Wight D, Kopchick J, Stambrook PJ. Reporter genes in transgenic mice. *Transgenic Res* 1994; 3: 182-94.
- Deng C, Capecchi MR. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 3365-71.
- DGE.<http://www.dge.de/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=4&page=9>; 14.07.2012.
- Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 1987; 330: 576-8.
- Doetschman T, Maeda N, Smithies O. Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 8583-7.
- Dymecki SM. Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6191-6.
- Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM, 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 6209-14.
- Elsae SH, Lucas RE. The mousetrap: what we can learn when the mouse model does not mimic the human disease. *ILAR J* 2002; 43: 66-79.
- Ensembl.[http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Location/View?db=core;g=ENSMUSG00000025630;r=X:52988137-53021659;t=ENSMUST00000026723](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/View?db=core;g=ENSMUSG00000025630;r=X:52988137-53021659;t=ENSMUST00000026723); 22.07.2012.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
- Evenson JK, Sunde RA. Selenium incorporation into selenoproteins in the Se-adequate and Se-deficient rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988; 187: 169-80.
- Farley FW, Soriano P, Steffen LS, Dymecki SM. Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis* 2000; 28: 106-10.

- Fedorov LM, Haegel-Kronenberger H, Hirchenhain J. A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic Res* 1997; 6: 223-31.
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 10887-90.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 752-7.
- Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132: 6-13.
- Fiering S, Epner E, Robinson K, Zhuang Y, Telling A, Hu M, Martin DI, Enver T, Ley TJ, Groudine M. Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev* 1995; 9: 2203-13.
- Fletcher JE, Copeland PR, Driscoll DM, Krol A. The selenocysteine incorporation machinery: interactions between the SECIS RNA and the SECIS-binding protein SBP2. *RNA* 2001; 7: 1442-53.
- Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 1973; 32: 132-4.
- Friedel RH, Soriano P. Gene trap mutagenesis in the mouse. *Methods Enzymol* 2010; 477: 243-69.
- Friedel RH, Wurst W, Wefers B, Kuhn R. Generating conditional knockout mice. *Methods Mol Biol* 2011; 693: 205-31.
- Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 1991; 5: 1513-23.
- Futcher AB. Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Theor Biol* 1986; 119: 197-204.
- Garrick D, Fiering S, Martin DI, Whitelaw E. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet* 1998; 18: 56-9.

- Gasdaska PY, Berggren MM, Berry MJ, Powis G. Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. *FEBS Lett* 1999; 442: 105-11.
- Ge K, Xue A, Bai J, Wang S. Keshan disease-an endemic cardiomyopathy in China. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983; 401: 1-15.
- Ge K, Yang G. The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 259S-63S.
- GGTC.[http://tikus.gsf.de/ggdc/database/summary\\_page\\_clones.php?mgi\\_id=1920930&gene\\_id=73680](http://tikus.gsf.de/ggdc/database/summary_page_clones.php?mgi_id=1920930&gene_id=73680); 30.06.2012.
- Ghim CM, Lee SK, Takayama S, Mitchell RJ. The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. *BMB Rep* 2010; 43: 451-60.
- Gopaul DN, Guo F, Van Duyne GD. Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *EMBO J* 1998; 17: 4175-87.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 7380-4.
- Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 9065-9.
- Grindley ND, Whiteson KL, Rice PA. Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 567-605.
- Gromer S, Wissing J, Behne D, Ashman K, Schirmer RH, Flohe L, Becker K. A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Biochem J* 1998; 332 ( Pt 2): 591-2.
- Gromer S, Johansson L, Bauer H, Arscott LD, Rauch S, Ballou DP, Williams CH, Jr., Schirmer RH, Arner ES. Active sites of thioredoxin reductases: why selenoproteins? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12618-23.
- Gronostajski RM, Sadowski PD. The FLP recombinase of the *Saccharomyces cerevisiae* 2 microns plasmid attaches covalently to DNA via a phosphotyrosyl linkage. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 3274-9.



- Guan C, Ye C, Yang X, Gao J. A review of current large-scale mouse knockout efforts. *Genesis* 2010; 48: 73-85.
- Guo F, Gopaul DN, van Duyne GD. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 1997; 389: 40-6.
- GV-SOLAS. <http://www.gv-solas.de/auss/gen/gen-p5.pdf>; 04.06.2012.
- Hamilton DL, Abremski K. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* 1984; 178: 481-6.
- Hasty P, Ramirez-Solis R, Krumlauf R, Bradley A. Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature* 1991; 350: 243-6.
- Hatfield DL, Gladyshev VN. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 3565-76.
- Hawkes WC, Wilhelmsen EC, Tappel AL. Abundance and tissue distribution of selenocysteine-containing proteins in the rat. *J Inorg Biochem* 1985; 23: 77-92.
- Henikoff S. Conspiracy of silence among repeated transgenes. *Bioessays* 1998; 20: 532-5.
- Hochman L, Segev N, Sternberg N, Cohen G. Site-specific recombinational circularization of bacteriophage P1 DNA. *Virology* 1983; 131: 11-7.
- Hohenstein P, Slight J, Ozdemir DD, Burn SF, Berry R, Hastie ND. High-efficiency Rosa26 knock-in vector construction for Cre-regulated overexpression and RNAi. *Pathogenetics* 2008; 1: 3.
- Holmgren A. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 1985; 54: 237-71.
- Huang HP, Hong CL, Kao CY, Lin SW, Lin SR, Wu HL, Shi GY, You LR, Wu CL, Yu IS. Gene targeting and expression analysis of mouse Tem1/endosialin using a lacZ reporter. *Gene Expr Patterns* 2011; 11: 316-26.
- Hunter NL, Awatramani RB, Farley FW, Dymecki SM. Ligand-activated Flpe for temporally regulated gene modifications. *Genesis* 2005; 41: 99-109.
- Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 4324-7.

- Jakupoglu C, Przemeck GK, Schneider M, Moreno SG, Mayr N, Hatzopoulos AK, de Angelis MH, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M, Conrad M. Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1980-8.
- Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, Zheng B, Bradley A. Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1955-63.
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 1984; 39: 499-509.
- Kaufman MH, Webb S. Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion. *Development* 1990; 110: 1121-32.
- Kaufman RJ. DNA transfection to study translational control in mammalian cells. *Methods* 1997; 11: 361-70.
- Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 2002; 32: 128-34.
- Kawai H, Ota T, Suzuki F, Tatsuka M. Molecular cloning of mouse thioredoxin reductases. *Gene* 2000; 242: 321-30.
- Kawase E, Suemori H, Takahashi N, Okazaki K, Hashimoto K, Nakatsuji N. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol* 1994; 38: 385-90.
- Keskindepe L, Norris K, Pacholczyk G, Dederscheck SM, Eroglu A. Derivation and comparison of C57BL/6 embryonic stem cells to a widely used 129 embryonic stem cell line. *Transgenic Res* 2007; 16: 751-8.
- Kohrle J, Gartner R. Selenium and thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23: 815-27.
- Krapp A, Knofler M, Ledermann B, Burki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbuchle O, Wellauer PK. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 1998; 12: 3752-63.

- Kruger A, Schirmacher V, Khokha R. The bacterial lacZ gene: an important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 285-94.
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 2003; 300: 1439-43.
- Kuehn MR, Bradley A, Robertson EJ, Evans MJ. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 1987; 326: 295-8.
- Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science* 1995; 269: 1427-9.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M,

- Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, International Human Genome Sequencing C. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
- Lee SR, Kim JR, Kwon KS, Yoon HW, Levine RL, Ginsburg A, Rhee SG. Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J Biol Chem* 1999; 274: 4722-34.
- Leiter EH, Prochazka M, Coleman DL. The non-obese diabetic (NOD) mouse. *Am J Pathol* 1987; 128: 380-3.
- Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 743-55.
- Linder CC. The influence of genetic background on spontaneous and genetically engineered mouse models of complex diseases. *Lab Anim (NY)* 2001; 30: 34-9.
- Linder CC. Genetic variables that influence phenotype. *ILAR J* 2006; 47: 132-40.
- Litov RE, Combs GF, Jr. Selenium in pediatric nutrition. *Pediatrics* 1991; 87: 339-51.
- Logie C, Stewart AF. Ligand-regulated site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5940-4.
- Longo L, Bygrave A, Grosveld FG, Pandolfi PP. The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic Res* 1997; 6: 321-8.
- Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem* 2009; 284: 723-7.

- Ludwig DL, Stringer JR. Spontaneous and induced homologous recombination between lacZ chromosomal direct repeats in CV-1 cells. *Somat Cell Mol Genet* 1994; 20: 11-25.
- Mack A, Sauer B, Abremski K, Hoess R. Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 4451-5.
- Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 1988; 336: 348-52.
- Mao X, Fujiwara Y, Chapdelaine A, Yang H, Orkin SH. Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood* 2001; 97: 324-6.
- Martin DI, Whitelaw E. The vagaries of variegating transgenes. *Bioessays* 1996; 18: 919-23.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 7634-8.
- Masui S, Shimosato D, Toyooka Y, Yagi R, Takahashi K, Niwa H. An efficient system to establish multiple embryonic stem cell lines carrying an inducible expression unit. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e43.
- Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J, Taketo MM. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol* 1996; 178: 179-85.
- Mattioni T, Louvion JF, Picard D. Regulation of protein activities by fusion to steroid binding domains. *Methods Cell Biol* 1994; 43 Pt A: 335-52.
- McCarrick JW, 3rd, Parnes JR, Seong RH, Solter D, Knowles BB. Positive-negative selection gene targeting with the diphtheria toxin A-chain gene in mouse embryonic stem cells. *Transgenic Res* 1993; 2: 183-90.
- McVicar DW, Winkler-Pickett R, Taylor LS, Makrigiannis A, Bennett M, Anderson SK, Ortaldo JR. Aberrant DAP12 signaling in the 129 strain of mice: implications for the analysis of gene-targeted mice. *J Immunol* 2002; 169: 1721-8.
- Meisler MH. Insertional mutation of 'classical' and novel genes in transgenic mice. *Trends Genet* 1992; 8: 341-4.

- Melton DW. Gene-targeting strategies. *Methods Mol Biol* 2002; 180: 151-73.
- Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 6991-5.
- Metzger D, Feil R. Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10: 470-6.
- Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 2001; 24: 71-80.
- Miranda-Vizuite A, Damdimopoulos AE, Spyrou G. cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene(1). *Biochim Biophys Acta* 1999a; 1447: 113-8.
- Miranda-Vizuite A, Damdimopoulos AE, Pedrajas JR, Gustafsson JA, Spyrou G. Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur J Biochem* 1999b; 261: 405-12.
- Misra RP, Bronson SK, Xiao Q, Garrison W, Li J, Zhao R, Duncan SA. Generation of single-copy transgenic mouse embryos directly from ES cells by tetraploid embryo complementation. *BMC Biotechnol* 2001; 1: 12.
- Moghadaszadeh B, Beggs AH. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 307-15.
- Moore RC, Redhead NJ, Selfridge J, Hope J, Manson JC, Melton DW. Double replacement gene targeting for the production of a series of mouse strains with different prion protein gene alterations. *Biotechnology (N Y)* 1995; 13: 999-1004.
- Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg PV. Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 2008; 68: 1555-60.
- Mühlhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 2009.
- Mukherjee A, Soyal SM, Wheeler DA, Fernandez-Valdivia R, Nguyen J, DeMayo FJ, Lydon JP. Targeting iCre expression to murine progesterone receptor cell-lineages using bacterial artificial chromosome transgenesis. *Genesis* 2006; 44: 601-10.
- Muller HJ. Artificial Transmutation of the Gene. *Science* 1927; 66: 84-7.

- Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux VR, Ivanyi E, Markkula M, Rossant J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 1990; 110: 815-21.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8424-8.
- Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000; 26: 99-109.
- Nagy A, Gerstenstein M, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory manual*. 3. Auflage. Cold Spring Harbor Press; 2003.
- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 351-69.
- Nakamura H. Thioredoxin as a key molecule in redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 15-7.
- Nakhai H, Sel S, Favor J, Mendoza-Torres L, Paulsen F, Duncker GI, Schmid RM. Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development* 2007; 134: 1151-60.
- Neuhierl B, Thanbichler M, Lottspeich F, Bock A. A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *J Biol Chem* 1999; 274: 5407-14.
- Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B, Felasa. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 2002; 36: 20-42.
- Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 2009; 460: 118-22.
- Nunes-Duby SE, Azaro MA, Landy A. Swapping DNA strands and sensing homology without branch migration in lambda site-specific recombination. *Curr Biol* 1995; 5: 139-48.
- Nunes-Duby SE, Kwon HJ, Tirumalai RS, Ellenberger T, Landy A. Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 391-406.



- Nyhan WL, Wong DF. New approaches to understanding Lesch-Nyhan disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 1602-4.
- O'Toole D, Raisbeck MF. Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7: 364-73.
- Orban PC, Chui D, Marth JD. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 6861-5.
- Palmiter RD, Brinster RL. Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet* 1986; 20: 465-99.
- Patenaude A, Ven Murthy MR, Mirault ME. Mitochondrial thioredoxin system: effects of TrxR2 overexpression on redox balance, cell growth, and apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 27302-14.
- Ponchio L, Duma L, Oliviero B, Gibelli N, Pedrazzoli P, Robustelli della Cuna G. Mitomycin C as an alternative to irradiation to inhibit the feeder layer growth in long-term culture assays. *Cytotherapy* 2000; 2: 281-6.
- Raymond CS, Soriano P. High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells. *PLoS One* 2007; 2: e162.
- Reid LH, Shesely EG, Kim HS, Smithies O. Cotransformation and gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 2769-77.
- Rinchik EM. Chemical mutagenesis and fine-structure functional analysis of the mouse genome. *Trends Genet* 1991; 7: 15-21.
- Rodemann HP, Hehr T, Bamberg M. [Relevance of the radioprotective effect of sodium selenite]. *Med Klin (Munich)* 1999; 94 Suppl 3: 39-41.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 2000; 25: 139-40.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; 179: 588-90.

- Roux E, Strubin M, Hagenbuchle O, Wellauer PK. The cell-specific transcription factor PTF1 contains two different subunits that interact with the DNA. *Genes Dev* 1989; 3: 1613-24.
- Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, Phipps EL. Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 5818-9.
- Sadowski PD. The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995; 51: 53-91.
- Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 5166-70.
- Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 1998; 14: 381-92.
- Sauer B, McDermott J. DNA recombination with a heterospecific Cre homolog identified from comparison of the pac-c1 regions of P1-related phages. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 6086-95.
- Saunders TL. Inducible transgenic mouse models. *Methods Mol Biol* 2011; 693: 103-15.
- Scherrer LC, Picard D, Massa E, Harmon JM, Simons SS, Jr., Yamamoto KR, Pratt WB. Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90. *Biochemistry* 1993; 32: 5381-6.
- Schimenti JC, Libby BJ, Bergstrom RA, Wilson LA, Naf D, Tarantino LM, Alavizadeh A, Lengeling A, Bucan M. Interdigitated deletion complexes on mouse chromosome 5 induced by irradiation of embryonic stem cells. *Genome Res* 2000; 10: 1043-50.
- Schwartz CJ, Sadowski PD. FLP recombinase of the 2 microns circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* bends its DNA target. Isolation of FLP mutants defective in DNA bending. *J Mol Biol* 1989; 205: 647-58.
- Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. *Nutrition* 1999; 15: 255.
- Schwenk F, Kuhn R, Angrand PO, Rajewsky K, Stewart AF. Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 1427-32.

- Seong E, Saunders TL, Stewart CL, Burmeister M. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends Genet* 2004; 20: 59-62.
- Sershen CL, Mell JC, Madden SM, Benham CJ. Superhelical duplex destabilization and the recombination position effect. *PLoS One* 2011; 6: e20798.
- Shi Y, Bassnett S. Inducible gene expression in the lens using tamoxifen and a GFP reporter. *Exp Eye Res* 2007; 85: 732-7.
- Shimada A, Komatsu K, Nakashima K, Poschl E, Nifuji A. Improved methods for detection of beta-galactosidase (lacZ) activity in hard tissue. *Histochem Cell Biol* 2012; 137: 841-7.
- Sibbing D, Pfeufer A, Perisic T, Mannes AM, Fritz-Wolf K, Unwin S, Sinner MF, Gieger C, Gloeckner CJ, Wichmann HE, Kremmer E, Schafer Z, Walch A, Hinterseer M, Nabauer M, Kaab S, Kastrati A, Schomig A, Meitinger T, Bornkamm GW, Conrad M, von Beckerath N. Mutations in the mitochondrial thioredoxin reductase gene TXNRD2 cause dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2011; 32: 1121-33.
- Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* 1997; 16: 19-27.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985; 317: 230-4.
- Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 1999; 21: 70-1.
- Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 2001; 1: 4.
- Stacey A, Schnieke A, McWhir J, Cooper J, Colman A, Melton DW. Use of double-replacement gene targeting to replace the murine alpha-lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1009-16.
- Stadtman TC. Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 83-100.

- Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 756-68.
- Stashak T. Adam's Lahmheiten bei Pferden. 4. Auflage. M. & H. Schaper-Verlag; 1989.
- Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 1981; 150: 467-86.
- Stout JT, Caskey CT. HPRT: gene structure, expression, and mutation. *Annu Rev Genet* 1985; 19: 127-48.
- Suda Y, Suzuki M, Ikawa Y, Aizawa S. Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential. *J Cell Physiol* 1987; 133: 197-201.
- Sudre P, Mathieu F. Kashin-Beck disease: from etiology to prevention or from prevention to etiology? *Int Orthop* 2001; 25: 175-9.
- Sun QA, Kirnarsky L, Sherman S, Gladyshev VN. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 3673-8.
- te Riele H, Maandag ER, Berns A. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 5128-32.
- Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 60: 523-33.
- Thomas JW, LaMantia C, Magnuson T. X-ray-induced mutations in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 1114-9.
- Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 1986; 44: 419-28.
- Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51: 503-12.
- Thompson S, Clarke AR, Pow AM, Hooper ML, Melton DW. Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 1989; 56: 313-21.

- Thyagarajan B, Guimaraes MJ, Groth AC, Calos MP. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* 2000; 244: 47-54.
- Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 24: 148-54.
- Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509-44.
- Turan S, Galla M, Ernst E, Qiao J, Voelkel C, Schiedlmeier B, Zehe C, Bode J. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges. *J Mol Biol* 2011; 407: 193-221.
- Turanov AA, Xu XM, Carlson BA, Yoo MH, Gladyshev VN, Hatfield DL. Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. *Adv Nutr* 2011; 2: 122-8.
- Udy GB, Parkes BD, Wells DN. ES cell cycle rates affect gene targeting frequencies. *Exp Cell Res* 1997; 231: 296-301.
- Utomo AR, Nikitin AY, Lee WH. Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 1091-6.
- Valancius V, Smithies O. Testing an "in-out" targeting procedure for making subtle genomic modifications in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1402-8.
- Van Duyne GD. A structural view of cre-loxp site-specific recombination. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001; 30: 87-104.
- Vasioukhin V, Degenstein L, Wise B, Fuchs E. The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8551-6.
- Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8403-10.
- Vegeto E, Allan GF, Schrader WT, Tsai MJ, McDonnell DP, O'Malley BW. The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell* 1992; 69: 703-13.
- Vernie LN. Selenium in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1984; 738: 203-17.
- Vinceti M, Wei ET, Malagoli C, Bergomi M, Vivoli G. Adverse health effects of selenium in humans. *Rev Environ Health* 2001; 16: 233-51.

- Wang ZQ, Kiefer F, Urbanek P, Wagner EF. Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech Dev* 1997; 62: 137-45.
- Ware CB, Siverts LA, Nelson AM, Morton JF, Ladiges WC. Utility of a C57BL/6 ES line versus 129 ES lines for targeted mutations in mice. *Transgenic Res* 2003; 12: 743-6.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420: 520-62.

- Wilber CG. Toxicology of selenium: a review. *Clin Toxicol* 1980; 17: 171-230.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988; 336: 684-7.
- Wilson L, Ching YH, Farias M, Hartford SA, Howell G, Shao H, Bucan M, Schimenti JC. Random mutagenesis of proximal mouse chromosome 5 uncovers predominantly embryonic lethal mutations. *Genome Res* 2005; 15: 1095-105.
- Wu H, Liu X, Jaenisch R. Double replacement: strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine Col1a-1 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 2819-23.
- Yanagawa Y, Kobayashi T, Ohnishi M, Kobayashi T, Tamura S, Tsuzuki T, Sanbo M, Yagi T, Tashiro F, Miyazaki J. Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. *Transgenic Res* 1999; 8: 215-21.
- Yu Y, Bradley A. Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 780-90.
- Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ. Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* 1977; 19: 128-35.
- Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 1531-6.
- Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3789-94.
- Zhang Y, Riesterer C, Ayrall AM, Sablitzky F, Littlewood TD, Reth M. Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 543-8.
- Zimmermann MB, Kohrle J. The impact of iron and selenium deficiencies on iodine and thyroid metabolism: biochemistry and relevance to public health. *Thyroid* 2002; 12: 867-78.



## 10 Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des pankreasspezifischen <i>knockouts</i> der mitochondrialen Thioredoxinreduktase. Kreuzung einer pankreasspezifischen Ptf1a-Cre Linie mit einer geflochtenen <i>Txnrd2</i> Mauslinie. ....	4
Abbildung 2: DreERT2 Linie im Hprt-Lokus. DreERT2-Transkription ist durch eine vorgeschaltete geflochte Stop-Kassette solange unterdrückt, bis die STOP-Kassette durch Cre-Rekombination entfernt wird. Das geschieht in einer pankreasspezifischen Ptf1a-Cre-Maus während der Embryonalentwicklung. Durch Rekombination der loxSTOPlox-Kassette wird DreERT2 zwar durch den ubiquitär aktiven CAGGs-Promotor exprimiert, jedoch erst durch die Bindung von Tamoxifen an die Steroidbindedomäne ERT2 wird Dre aktiviert. ....	5
Abbildung 3: <i>Txnrd2</i> -IresLacZ Linie im ROSA26-Lokus. Das durch Tamoxifenbindung aktivierte DreERT2 entfernt durch Rekombination der rox-sites die STOP-Kassette vor <i>Txnrd2</i> und führt damit zum genetischen <i>rescue</i> von <i>Txnrd2</i> im <i>knockout</i> . Die erfolgreiche Rekombination kann in vitro durch $\beta$ -gal Färbung aufgrund der Ires getriebenen Expression des Reportergens LacZ verifiziert werden. ....	6
Abbildung 4: Ablauf der Generierung transgener Mäuse und Kreuzungsschema zur Etablierung des genetischen <i>rescue</i> des pankreasspezifischen <i>knockouts</i> der mitochondrialen Thioredoxinreduktase durch einen induzierbaren <i>knockin</i> der <i>Txnrd2</i> . ....	9
Abbildung 5: Abhängig von Lage und Orientierung der loxP Stellen (schwarzes Dreieck) gibt es unterschiedliche Rekombinationsmöglichkeiten (Exzision, Inversion und Translokation). Mit rot/rosa ist das Insert gekennzeichnet, das Genom mit blau. (A) Exzision und reverse Insertion: loxP Stellen sind gleichgerichtet; (B) Inversion: loxP Stellen sind gegensätzlich; (C) Translokation: loxP Stellen befinden sich auf verschiedenen DNA-Molekülen in gleicher Richtung (modifiziert nach (Metzger & Feil, 1999)). ....	13
Abbildung 6: Entwicklung der Bedeutung des Selen im Verlauf des 20. Jahrhunderts. Zu Beginn noch als gefährliches Toxin angesehen wandelt sich der Ruf des Selen über das eines Karzinogens zu einem essentiellen Spurenelement hin zu einem antikarzinogen wirkenden Nahrungssupplement (Vernie, 1984). ....	23
Abbildung 7: Insertionsmechanismus von Selenocystein (Sec) in Selenoproteine. Die Sec-beladene Sec tRNA <sup>[Ser]Sec</sup> (in rot mit Sec in gelb) wird als Komplex mit EFsec (in blau), SBP2 (in grün) und dem SECIS-Element (Haarnadelstruktur) an das Ribosom gebunden (ebenfalls in blau). Das UGA-Codon dient dabei als Selenocystein- und nicht wie üblicherweise als Stop-Codon und dadurch erfolgt die Insertion von Sec in die wachsende Peptidkette (gelb/blau) (Hatfield & Gladyshev, 2002). ....	26
Abbildung 8: Das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase System. Schematische Darstellung der Reduktion der Disulfide des oxidierten Thioredoxin (TRX-S <sub>2</sub> ) zu TRX-(SH) <sub>2</sub> durch die Thioredoxinreduktase (TXNRD) und NADPH. TRX-(SH) <sub>2</sub> reduziert Proteindisulfide durch Oxidoreduktaseaktivität, wodurch es selbst oxidiert wird (TRX-S <sub>2</sub> ) (modifiziert nach (Arner & Holmgren, 2000)). ....	28

Abbildung 9: Glatte und überhängende Enden durch Restriktionsverdau. Entstehung glatter Enden am Beispiel des Restriktionsverdaus mit SmaI und überhängender Enden am Beispiel des Restriktionsverdaus mit EcoRI (5'-Überhang) bzw. PvuI (3'-Überhang). ....	50
Abbildung 10: Ligationsreaktion von <i>sticky end</i> Fragmenten nach Restriktionsverdau am Beispiel des Restriktionsenzym EcoRI. ....	53
Abbildung 11: BP-Klonasereaktion. Das Gen von Interesse wird durch die spezifische Rekombination der <i>attB-sites</i> mit den <i>attP-sites</i> des Donorvektors im Eingangsvektor von <i>attL-sites</i> flankiert. Zur Selektion bedient man sich der Kanamycinresistenz (Kan <sup>R</sup> ) sowie des Selbstmordgens <i>ccdB</i> . ....	59
Abbildung 12: LR-Klonasereaktion. Das Gen von Interesse des Eingangsvektors wird durch die spezifische Rekombination der <i>attL-sites</i> mit den <i>attR-sites</i> des Zielvektors in das Expressionsplasmid kloniert. Zur Selektion bedient man sich eines Resistenzwechsels von der Kanamycin- (Kan <sup>R</sup> ) zur Apicillinresistenz (Amp <sup>R</sup> ) sowie des Selbstmordgens <i>ccdB</i> . ....	60
Abbildung 13: Expressionvektor pcDNA <sup>TM</sup> 6.2/EmGFP-Bsd/V5-DEST (Fa. Invitrogen, <a href="http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V36620?ICID==%3D%3D%3Dsearch-v36620;20.06.2012">http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V36620?ICID==%3D%3D%3Dsearch-v36620;20.06.2012</a> ). Der CMV-Promotor (P <sub>CMV</sub> ) ermöglicht ein hohes Expressionsniveau in der Zellkultur und ein schnelles und gerichtetes Einklonieren wird durch vorhandene <i>attR-sites</i> ermöglicht. ....	63
Abbildung 14: Aufbau des Western Blots. Die Transferrichtung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte in einem Elektrophoret von der Kathode zur Anode und damit vom Gel auf die Membran. ....	69
Abbildung 15: Prinzip der ECL Detektion. Durch die HRP-katalysierte Oxidation von Luminol entsteht eine Chemilumineszenz, die mittels Röntgenfilm detektiert werden kann. ....	70
Abbildung 16: IDG3.2 ES-Zelllinie ((C57BL/6J x 129S6/SvEvTac) F1). ....	71
Abbildung 17: Schematische Darstellung des TaqMan Verfahrens. Im ersten Schritt des TaqMans hybridisiert Sonde und Primer an den DNA-Matrizenstrang. Anschließend erfolgt von den Primern ausgehend die Elongation der Zielsequenz durch die Taq-Polymerase (P) durch Anhängen von Nukleotiden. Dabei wird die Sonde beginnend am 5'-Ende vom DNA-Strang hydrolytisch abgespalten, wodurch eine räumliche Trennung zwischen Reporter (R) und Quencher (Q) entsteht. Dadurch wird die Unterdrückung des Fluoreszenzsignals durch die räumliche Nähe zum Quencher aufgehoben und die Fluoreszenz des Reporters kann gemessen werden. ....	77
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Southern Blot Analyse. Die DNA wurde durch Restriktionsverdau geschnitten und die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Übertragung der aufgetrennten DNA auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mittels Kapillarkraft durch den Durchfluss einer Salzlösung über die unten liegenden Filterpapiere, deren Enden in einer Wanne mit SSC-Puffer hängen, über das Gel und die Membran zu den an der Oberfläche befindlichen Filterpapieren und Zellstoff. Die spezifische Bindung radioaktiv markierter Sonde an gewünschte DNA-Fragmente kann über einen Röntgenfilm detektiert werden. ....	80
Abbildung 19: Zeitverlauf der Hormonbehandlung und Verpaarung beim Embryotransfer. ....	85

Abbildung 20: Schema zur Generierung der geflochtenen <i>Txnrd2</i> -Linie. Die loxP-Sequenzen (weiße Dreiecke) flankieren die Exons 15 bis 18 und die für die Selektion der ES-Zellklone eingefügte neo-Kassette wird von FRT-sites (graue Dreiecke) umspannt. Die neo-Kassette wird durch Flp vermittelte Rekombination entfernt und durch Kreuzung mit einer Cre-rekombinanten Mauslinie erfolgt die Rekombination der loxP-Sequenzen und damit der <i>knockout</i> von <i>Txnrd2</i> durch Entfernung der Exons 15 bis 18 (Schema modifiziert nach (Conrad et al., 2004)).	88
Abbildung 21: Schema Ptf1a-Cre <sup>tg/wt</sup> Mauslinie. Die neo-Kassette zur Selektion der ES-Zellklone wurde durch Flp vermittelte Rekombination der FRT-sites (graue Dreiecke) entfernt. (Schema modifiziert nach (Aichler, 2007)).	89
Abbildung 22: Kreuzungsschema zur Generierung des pankreasspezifischen <i>Txnrd2</i> <i>knockouts</i> . In der F2 Generation erhält man den pankreasspezifischen <i>Txnrd2</i> <i>knockout</i> (Schema modifiziert nach (Aichler, 2007)).	90
Abbildung 23: Schema des Targetingvektors für den ROSA26-Lokus. Die Expression von <i>Txnrd2</i> -IresLacZ wird durch die mit rox-sites flankierte STOP-Kassette verhindert.	93
Abbildung 24: Targetingvektor pROSA-roxSTOProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ zur homologen Rekombination in den ROSA26-Lokus.	99
Abbildung 25: Schema des Targetingvektors für den Hprt-Lokus. Die Expression von DreERT2 durch den CAGGs-Promotor wird durch die vorangeschaltete, geflochte STOP-Kassette verhindert. Durch die Fusion mit ERT2 wird Dre erst durch Tamoxifenbindung an die Steroidbindedomäne ERT2 aktiviert und gelangt in den Zellkern. Somit ist eine zeitliche Induktion des <i>knockins</i> möglich.	100
Abbildung 26: Targetingvektor pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 zur homologen Rekombination in den Hprt-Lokus.	112
Abbildung 27: pcDNA6.2-rox- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ und pcDNA6.2-rox-LacZ zur in vitro Überprüfung der Targetingvektoren.	113
Abbildung 28: β-gal Färbung der transient transfizierten Plasmide pcDNA6.2-rox- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ und pcDNA6.2-rox-LacZ, sowie einer Negativ- und Positivkontrolle. Sowohl bei den Plasmiden wie auch bei der Positivkontrolle sind β-gal positive Zellkerne (~2%) im Gegensatz zur Negativkontrolle erkennbar.	114
Abbildung 29: β-gal Färbung der stabilen Transfektion von pcDNA6.2-rox- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ. Die Transfektionseffizienz lag bei 90% und bestätigte damit die Wirksamkeit der Expression von <i>Txnrd2</i> -IresLacZ.	115
Abbildung 30: in vitro Exzision der geflochtenen STOP-Kassette vor DreERT2 durch Cre-Rekombinase.	116
Abbildung 31: Nachweis der Exzision der STOP-Kassette und damit der in vitro Rekombination der loxP-sites durch die Cre-Rekombinase mittels PCR (verwendete Primer: CAGGs-sc-UP4, Dre-sc-LP3). Die Entfernung der STOP-Kassette wurde sowohl bei einem Ansatz mit 1unit als auch mit 5unit Cre-Rekombinase bei einer spezifischen Bande von 427bp bestätigt.	116

Abbildung 32: Bestätigung der Integration von pcDNA6.2-rox-STOPProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ in MIA PaCa-2 Zellen per stabiler Transfektion mit EmGFP als zusätzliches Reportersystem.	117
Abbildung 33: Prüfung der Dichtigkeit der roxSTOPProx-Kassette. Die stabile Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ wurde transient mit einem Leervektor transfiziert. Der Leervektor hat keine Rekombinationseffizienz auf die rox-sites und damit wird die STOP-Kassette nicht entfernt. Somit bleibt die Expression von LacZ verhindert, weshalb die $\beta$ -gal Färbung negativ bleibt.	118
Abbildung 34: $\beta$ -gal Färbung der transienten Transfektion der stabilen Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ mit einem Leervektor. Aufgrund fehlender Rekombination sind mit Ausnahme weniger Zellen ( $\sim 0,2\%$ , siehe $\rightarrow$ ) keine $\beta$ -gal positiven Zellkerne vorhanden. Somit bestätigte sich die Dichtigkeit der roxSTOPProx-Kassette.	119
Abbildung 35: Prüfung der Dichtigkeit der loxSTOPlox-Kassette. Die stabile Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ wurde transient mit dem Plasmid pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 transfiziert. Das Plasmid erzeugt aufgrund der ausgestoppten Dre-Kassette keine Dre-Expression und damit keine Rekombinationseffizienz auf die rox-sites. Die STOP-Kassette wurde deshalb nicht entfernt. Die Expression von LacZ wird verhindert, wodurch die $\beta$ -gal Färbung negativ bleibt.	119
Abbildung 36: $\beta$ -gal Färbung der transienten Transfektion der stabilen Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ mit dem Plasmid pEntr-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2. Aufgrund fehlender Rekombination sind mit Ausnahme weniger Zellen ( $\sim 0,3\%$ , siehe $\rightarrow$ ) keine $\beta$ -gal positiven Zellkerne vorhanden. Somit bestätigte sich die Dichtigkeit der loxSTOPlox-Kassette.	120
Abbildung 37: Prüfung der Rekombinationseffizienz von Dre. Die stabile Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ wurde transient mit dem Plasmid CAGGs-Dre transfiziert. Dre rekombiniert dabei die rox-sites und entfernt die STOP-Kassette vor <i>Txnrd2</i> -IresLacZ. Die Expression von LacZ wird durch blau gefärbte Zellkerne nach $\beta$ -gal Färbung bestätigt.	121
Abbildung 38: $\beta$ -gal Färbung der transienten Transfektion der stabilen Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ mit dem Plasmid CAGGs-Dre. Durch Rekombination der rox-sites durch Dre kommt es aufgrund der entfernten STOP-Kassette zur Expression von <i>Txnrd2</i> -IresLacZ. Eine Rekombinationseffizienz von $\sim 90\%$ konnte durch $\beta$ -gal Färbung bestätigt werden.	122
Abbildung 39: Prüfung der Rekombinationseffizienz von DreERT2. Die stabile Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ wurde transient mit dem Plasmid pEntr-CAGGs-lox-DreERT2 unter Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen transfiziert. Dre gelangt durch Bindung von 4-Hydroxytamoxifen an dessen Steroidbindedomäne in den Zellkern und rekombiniert die roxSTOPProx-Kassette. Mit der $\beta$ -gal Färbung konnte die Expression der IresLacZ-Kassette nachgewiesen werden.	123
Abbildung 40: $\beta$ -gal Färbung der transienten Transfektion der stabilen Zelllinie pcDNA6.2-roxSTOPProx- <i>Txnrd2</i> -IresLacZ mit dem Plasmid pEntr-CAGGs-lox-DreERT2. Nach 4-Hydroxy-tamoxifenbindung an die Steroidbindedomäne ERT2 gelangte Dre in den Zellkern. Dre rekombinierte dort die rox-sites, so dass es zur Expression von <i>Txnrd2</i> -IresLacZ ( $\sim 80\%$ ) kam.	124

Abbildung 41: Western Blot zur Bestätigung der Überexpression von Txnrd2. Stabil transfizierte Zelllinien (SZL) von pcDNA6.2-rox-Txnrd2-IresLacZ zeigten eine Überexpression von TXNRD2 im Vergleich zur endogenen Proteinexpression der untransfizierten MIA PaCa-2 Kontrolle. ....	125
Abbildung 42: Western Blot zur Bestätigung der Expression des FLAG-tags. Die Expression des FLAG-tags der SZL_17 und SLZ_30 bestätigt die Einklonierung von Txnrd2.....	125
Abbildung 43: Einklonierung der Primerbindungsstelle P <sub>Hprt</sub> 5' des kurzen homologen Arms des Hprt-Endvektors. Diese entspricht der genomischen DNA des Hprt-Lokus zur Testung der späteren ES Screen-PCR. ....	127
Abbildung 44: Bestätigung der Einklonierung der Primerbindungsstelle P <sub>Hprt</sub> in den kurzen Arm des Plasmids pDTA-P <sub>Hprt</sub> -Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2. Ohne einklonierte Bindungsstelle ergab sich eine Bande von 258bp und bei erfolgreicher Einklonierung von 302bp. Von 32 gepickten Klonen zeigten alle eine Einklonierung der Primerbindungsstelle durch eine spezifische Bande von 302bp. Als Negativkontrolle (-) wurde das Plasmid pDTA-Hprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 verwendet. ....	128
Abbildung 45: Bestätigung der gerichteten Ligation der Primerbindungsstelle in den kurzen Arm von Hprt. Bei gerichteter Ligation ergaben sich Banden bei 226bp und 75bp (siehe Klon 9 und Klon 29) und bei ungerichteter Einklonierung bei 198bp und 105bp (siehe Klon 1 und Klon 17). ....	128
Abbildung 46: Etablierung der ES Screen-PCR der Hprt-Klone. Bis zu einer Verdünnungsstufe von 10 <sup>-8</sup> ist eine spezifische Bande bei ~3,3kb sichtbar.....	129
Abbildung 47: Überprüfung und Linearisierung der Targetingvektoren für die Elektroporation in IDG3.2 ES-Zellen. Beide Plasmide wurden auf Vollständigkeit durch XhoI-Verdau geprüft (als Größenstandard wurde die 2-Log DNA Ladder verwendet). Für den ROSA26-Lokus wurde die Linearisierung mit PacI und für den Hprt-Lokus mit PmeI durchgeführt (Größenstandard: 1Kb DNA Extension Ladder). ....	130
Abbildung 48: ES Screen-PCR der ROSA26-Zellklone. Korrekte Integration in den ROSA26-Lokus ergab eine spezifische Bande bei 1194bp. ....	132
Abbildung 49: Überprüfung der Anwesenheit der pA-site der ROSA26-Klone. Eine vollständige Integration des Plasmids konnte bei einer spezifischen Bande von 440bp verifiziert werden. ....	132
Abbildung 50: Überprüfung der Vollständigkeit des homolog rekombinierten Transgens durch PCR an der STOP-Txnrd2-Kassette. Die ROSA26-Klone 2, 6, 7, 9, 13 und 35 zeigten die korrekte Bande bei 1343bp. ....	133
Abbildung 51: Schema der homologen Rekombination des Targetingvektors pROSA-roxSTOProx-Txnrd2-IresLacZ in das Intron 1 des ROSA26-Lokus. Farblich markiert sind die Primerpaare für die Bestätigung der korrekten Integration einer Einzelkopie. ....	133
Abbildung 52: Überprüfung der Häufigkeit der Integration des Transgens in den ROSA26-Lokus. Die Klone zeigten ein neo/β-Aktin Verhältnis, das dem der heterozygoten Kontrolle und damit einer Einfachintegration entsprach. ....	135



Abbildung 53: Bestätigung der 5' homologen Rekombination des Targetingvektors in den Hprt-Lokus. Von 791 konnten insgesamt 49 Einzelklone in der PCR durch eine spezifische Bande bei 3253bp bestätigt werden.....	137
Abbildung 54: Schema der homologen Rekombination des Targetingvektors pHprt-CAGGs-loxSTOPlox-DreERT2 in das Exon 3 des Hprt-Lokus. In Farbe sind die Schnittstellen BamHI und HindIII dargestellt sowie die Lage der Sonden farbig markiert.....	138
Abbildung 55: Bestätigung der korrekten, einmaligen Rekombination des Transgens in den Hprt-Lokus. Von insgesamt neun getesteten ES-Zellklonen konnten sieben (Klon 71, 72, 81, 84, 86, 87, 88) durch Southern Blot Analyse mit einiger Sicherheit als einmalig korrekt integriert bestätigt werden. ....	139
Abbildung 56: PCR auf Mykoplasmenfreiheit der ROSA26- und Hprt-Klone. Alle ES-Zellklone, die durch PCRs/TaqMan (ROSA26) bzw. durch Southern Blot (Hprt) als korrekt homolog rekombiniert ermittelt wurden, erwiesen sich als Mykoplasmen-negativ. Bei einer Mykoplasmen-Kontamination erscheint eine Bande bei ca. 267bp und bei einer negativen Probe die interne Kontrolle bei 191bp. ....	140
Abbildung 57: Chimärismusgrad der F0-Generation. Das Fell der Chimären wies einen bis zu 70%igen Grad an Chimärismus auf (Anteil des agouti-farbenen Fells der ES-Zellen zum schwarzen Fell der Blastozyste).....	142
Abbildung 58: $\beta$ -gal Färbung von Embryonen am Embryonaltag E14.5 aus der Verpaarung CAGGs-Dre mit ROSA26-roxSTOPprox-Txnrd2-IresLacZ. $\beta$ -gal positive Tiere (rechter Embryo) weisen eine Rekombination der rox-sites durch Dre mit Entfernung der STOP-Kassette und damit der Expression von Txnrd2-IresLacZ als Einheit nach. Embryonen, die genotypisch nur das veränderte R26-Allel aufwiesen, zeigten keine $\beta$ -gal Färbung (linker Embryo) und damit konnte die Dichtigkeit der roxSTOPprox-Kassette auch in vivo bestätigt werden.....	144

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Biochemische Funktion der Selenoproteinfamilien Thioredoxinreduktase, Glutathionperoxidase und Dejodinasen (modifiziert nach (Moghadaszadeh & Beggs, 2006; Lu & Holmgren, 2009)). ....	26
Tabelle 2: Ansatz für einen Restriktionsverdau.....	51
Tabelle 3: Reaktionsansatz für Dephosphorylierung.....	51
Tabelle 4: Reaktionsansatz zur Herstellung glatter Enden ( <i>blunt ends</i> ). ....	52
Tabelle 5: Reaktionsansatz für die Ligation. ....	53
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen zur Amplifikation von Dre.....	56
Tabelle 7: Reaktionsbedingungen für eine Screen-PCR von Einzelklonen. ....	57
Tabelle 8: Cre-Rekombinase Reaktionsansatz.....	65

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen zum Nachweis der Entfernung der STOP-Kassette. ....	65
Tabelle 10: Reaktionsbedingungen für die ROSA26 ES Screen-PCR.....	75
Tabelle 11: Reaktionsbedingungen zur Überprüfung der ROSA26-Klone. ....	75
Tabelle 12: Reaktionsbedingungen TaqMan.....	79
Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für die Hprt ES Screen-PCR. ....	79
Tabelle 14: Reaktionsbedingungen zur Genotypisierung der geflochten mitochondrialen Thioredoxinreduktase Mauslinie.....	88
Tabelle 15: Reaktionsbedingungen zur Genotypisierung der Ptf1a-Cre <sup>tg/wt</sup> Mauslinie. ....	90
Tabelle 16: Reaktionsbedingungen zur Genotypisierung der CAGGs-Dre Mauslinie.....	91
Tabelle 17: Reaktionsbedingungen ROSA26-PCR.....	92
Tabelle 18: Einzelschritte zum Erhalt des Targetingvektors pROSA-roxSTOProx-Txnrd2- IresLacZ. ....	94
Tabelle 19: Einzelschritte zum Erhalt des Targetingvektors pHprt-CAGGs-loxSTOPlox- DreERT2. ....	100
Tabelle 20: Gesamtanzahl $\beta$ -gal gefärbter Tiere mit Darstellung der Genotypen. ....	144

### 10.3 Formelverzeichnis

Formel 1: Formel für die Berechnung der Transfektionseffizienz. ....	64
--	----

### 10.4 Abkürzungsverzeichnis

$\Delta t3$	Verlängerung der Annealingtemperatur um 3 Sekunden pro Zyklus
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{F}$	Mikro-Farad
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
6-TG	6-Thioguanin



A260/A280	Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm/280nm
ad	Wasserkontrolle (PCR)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
aph(3')-II bzw. NPTII	Aminoglykosid3'-Phosphotransferase
APRT	Adenin-Phosphoribosyltransferase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
att	<i>attachment</i>
AVM	Abteilung für Vergleichende Medizin
BDF1	Hybrid-Mausstamm B6D2F1/J ((C57BL/6JxDBA2)F1)
BHQ1	<i>Black Hole Quencher</i>
BL/6	C57BL/6J/DCM
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAGGs	Promotor aus dem Cytomegalovirus-Enhancer, dem chicken $\beta$ -Aktin Promotor und dem rabbit $\beta$ -Globin poly(A) Signal
ccdB	<i>coupled cell division B gene</i>
CD-1	CrI:CD-1(ICR)/DCM
cLacZ	Zytoplasmatische $\beta$ -Galaktosidase
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMV	Cytomegalo-Virus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cpm	<i>counts per minute</i>
Cre	<i>causes recombination</i>
ct	<i>cycle threshold</i>

d.h.	das heißt
Da	Dalton
DCM	<i>Department of Comparative Medicine</i>
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DIOs	Dejodinasen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpc	Tage post coitum
DT	Diphtherietoxin-Kassette
DTA	Diphtherietoxin A Fragment
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
E. coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF <sub>sec</sub>	Sec-spezifischer Elongationsfaktor
EF-Tu	<i>elongation factor thermo unstable</i>
EmGFP	<i>Emerald green fluorescent protein</i>
EMMA	<i>European Mouse Mutant Archive</i>
engl.	Englisch
ENU	N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	und andere
F0	Chimärengeneration
F1	erste Filialgeneration
Fa.	Firma

FAD	Flavinadenindinucleotid
FAM	6-Carboxyfluorescein
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FKS	Fötales Kälberserum
fl/fl	Mauslinie mit einem Genabschnitt oder einer STOP-Kassette, die flankiert wird von loxP-sites („gefloxt“)
fmol	Femtomol
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FRT	<i>Flp recognition target</i>
g	Gramm
G418	Geneticin
GGTC	<i>german gene trap consortium</i>
GPxs	Glutathionperoxidasen
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
hCG	human Chorionic Gonadotropin
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
HSP	Hitzeschockprotein
i.d.R.	in der Regel
ICM	<i>inner cell mass</i>
IDG	Institut für Entwicklungs-genetik ( <i>Institute of developmental genetics</i> )
IDG3.2	Hybrid-ES-Zelllinie ((C57BL/6Jx129S6/SvEvTac)F1)
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
IVC	einzel belüfteter Käfig ( <i>individually ventilated cage</i> )
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar
KCM	<u>K</u> alium-/ <u>C</u> alcium-/ <u>M</u> agnesiumchlorid
kDa	Kilodalton

konz.	Konzentriert
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LIF	Leukämie inhibierender Faktor ( <i>leukemia inhibitory factor</i> )
loxP	<i>locus of crossing over in P1</i>
M	molar
mA	Milliampere
max.	maximal
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
MIA PaCa-2	humane Pankreaskarzinomzelle
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MMC	Mitomycin C
MP	Milchpulver
MP-TBST	5% Milchpulver in 1xTBST
mRNA	mitochondriale RNA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Na-Citrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
neo	Neomycin-Phosphotransferase II (nptII)
ng	Nanogramm
nlsLacZ	nukleäre β-Galaktosidase
nm	Nanometer

nM	Nanomolar
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i>
nptII	Neomycin-Phosphotransferase II
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p.c.	post coitum
P/S	Penicillin/Streptomycin
pA-site	Polyadenylierungsstelle
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pcDNA6.2	pcDNA <sup>TM</sup> 6.2/EmGFP-Bsd/V5-DEST-Klonierungsvektor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglycerokinase
PMSG	Pregnant Mare's Serum Gonadotropin
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
Ptf1a-p48	Pankreastranskriptionsfaktor 1a- Untereinheit 48
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion ( <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> )
r/r	Mauslinie mit einem Genabschnitt oder einer STOP-Kassette, die flankiert wird von rox-sites („gerox“)
R26	ROSA26-Lokus
R26R	Cre-Reporter ROSA26R
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
RMCE	<i>recombinase mediated cassette exchange</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
ROSA	<i>reverse orientation splice acceptor</i>
rox	<i>region of crossover</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur

s.	siehe
SA	Spleiß-Akzeptor
SBP2	SECIS-binding protein 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
Se	Selen
Sec	Selenocystein
SECIS	<i>Selenocysteine insertion sequence</i>
sek	Sekunden
Ser	Serin
sog.	sogenannt
SPF	spezifiziert Pathogenfrei
SSC	Standard Saline- Citrat- Puffer
SSR	sequenzspezifische Rekombinationssysteme
Stbl3	<i>One Shot Stbl 3 Chemically Competent E. coli</i>
SV40	Simian Virus 40
SZL	Stabil transfizierte Zelllinie
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TE	Tris EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Handelsmarke („Trademark“)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TRX	Thioredoxin
Trx	Thioredoxin
TUM	Technische Universität München

<i>Txnrd</i> s; <i>TrxR</i> s	Thioredoxinreduktase
<i>Txnrd1</i>	zytosolische Thioredoxinreduktase
<i>Txnrd2</i>	mitochondriale Thioredoxinreduktase
u.a.	unter anderem
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indoyl- $\beta$ -D-galaktosid
z.B.	zum Beispiel
$\beta$ -gal	$\beta$ -Galaktosidase

## 10.5 Aminosäuresequenzen

### DreERT2

MGASELIISGSSGGFLRNIGKEYQEAAENF  
MRFMNDQGAYAPNTLRDLRLVFHSWARW  
CHARQLAWFPISPEMAREYFLQLHDADLAS  
TTIDKHYAMLNMLLSHCGLPPLSDDKSVSL  
AMRRIRREAATEKGERTGQAIPLRWDDLKL  
LDVLLSRSERLVDLRNRAFLFVAYNTLMRM  
SEISRIRVGDLDTGTDTVTLHISHTKTITTAA  
GLDKVLSRRTTAVLNDWLDVSGLREHPDA  
VLFPPIHRSNKARITTTPLTAPAMEKIFSDA  
WVLLNKRDATPNKGRYRTWTGHSARVGA  
AIDMAEKQVSMVEIMQEGTWKKPETLMRY  
LRRGGVSVGANSRLMDSLEPSAGDMRAA  
NLWPSPLMIKRSKKNSLALSLTADQMVSAL  
LDAEPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNL  
ADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLL  
ECAWLEILMIGLVWRSMEHPVKLLFAPNLL  
LDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMM  
NLQGEEFVCLKSIILLNSGVYTFLLSSTLKSLE  
EKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQH  
QRLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCK  
NVVPLYDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVE  
ETDQSHLATAGSTSSHSLQKYYITGEAEGF  
PATA



	( <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> ; 17.09.2012)
<b>HPRT</b>	<p>MPTRSPSVVISDDEPGYDLDFCIPNHYAE DLEKVFIPHGLIMDRTERLARDVMKEMGGH HIVALCVLKGGYKFFADLLDYIKALNRNSDR SIPMTVDFIRLKSYPNDQSTGDIKVIGGDDL STLTGKNVLIVEDIIDTGKTMQTLLSLVKQYS PKMVKVASLLVKRTSRSVGYRPDFVGFEP DKFVVGALDYNEYFRDLNHVCVISETGKA KYKA</p> <p>(<a href="http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Transcript/Sequence_Protein?db=core;g=ENSMUSG000000025630;r=X:50341314-50374836;t=ENSMUST000000026723">http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Transcript/Sequence_Protein?db=core;g=ENSMUSG000000025630;r=X:50341314-50374836;t=ENSMUST000000026723</a>; 21.07.2012)</p>
<b>neo</b>	<p>MGSAIEQDGLHAGSPAAWVERLFGYDWA QQTIGCSDAAVFRLSAQGRPVLFVKTDLSG ALNELQDEAARLSWLATTGVPCAAVLDDVT EAGRDWLLLGEVPGQDLLSSHLAPAEKVSI MADAMRRLHTLDPATCPFDHQAKHRIERA RTRMEAGLVDQDDLDEEHQGLAPAEFAR LKARMPDGDDLVTTHGDACLPNIMVENGR FSGFIDCGRLGVADRYQDIALATRDIAEELG GEWADRFLVLYGIAAPDSQRIAFYRLLEDF F</p> <p>(<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>; 17.09.2012)</p>
<b>nlsLacZ</b>	<p>MDPVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFA SWRNSEEARTDRPSQQLRSLNGEWRFAW FPAPEAVPESWLECDLPEAVPKKCRKVEA DTVVPNSNWQMHGYDAPIYTNVTYPITVNP PFVPTENPTGCYSLTFNVDESWLQEGQTRI IFDGVNSAFHLWCNGRWVGYGQDSRLPS EFDLSAFLRAGENRLAVMVLRWSDGSYLE DQDMWRMSGIFRDVSLLHKPTTQISDFHV ATRFNDDFSRAVLEAEVQMCGELRDYLRV TVSLWQGETQVASGTAPFGGEIIDERGGY ADRVTLRLNVENPKLWSAEIPNLYRAVEL HTADGTLIEAEACDVGFREVRIENGLLLNG KPLLIRGVNRHEHHPLHGQVMDEQTMVQD ILLMKQNNFNAVRC SHYPNHPLWYTLCDR YGLYVVDANIETHGMVPMNRLTDDPRWL PAMSERVTRMVQRDRNHPSVIIWSLGNES GHGANHDALYRWIKSVDPSPVPVQYEGGG ADTTATDIICPMYARVDEDQPFPAVPKWSI KKWLSLPGETRPLILCEYAHAMGNSLGGFA KYWQAFRQYPRLQGGFVWDWVDQSLIKY</p>

	<p>DENGNPWSAYGGDFGDTPNDRQFCMNGL VFADRTPHPALTEAKHQQQFFQFRLSGQTI EVTSEYLFRHSDNELLHWMVALDGKPLAS GEVPLDVAPQGKQLIELPELPQPESAGQL WLTVRVVQPNATAWSEAGHISAWQQWRL AENLSVTLPAAASHAIPHLTTSEMDFCIELGN KRWQFNRRQSGFLSQMWIGDKKQLLTPLRD QFTRAPLDNDIGVSEATRDPNAWVERWK AAGHYQAEAAALLQCTADTLADAVLITTAHA WQHQQKTLFISRKTYRIDGSGQMAITVDVE VASDTPHPARIGLNCQLAQVAERNVWLGL GPQENYPDRLTAACFDRWDLPLSDMYTPY VFPSENGLRCGTRELNYGPHQWRGDFQF NISRYSQQQLMETSHRHLLHAEEGTWLNID GFHMGIGGDDSWSPSVSAEFQLSAGRYHY QLVWCQK</p> <p>(<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>; 17.09.2012)</p>
<b>TXNRD2</b>	<p>MAAMVAAMVAALRGPSRRFRPRTRALTRG TRGAASAAGGQQSFDLLVIGGGSGGLACA KEAAQLGKKVAVADYVEPSPRGTKWGLGG TCVNVGCIPKKLMHQAALLGGMIRDAHHY GWEVAQPVQHNWKTMAEAVQNHVKS LN WGHRVQLQDRKVYFNIKASFVDEHTVRG VDKGGKATLLSAEHIVIATGGRPRYPTQVK GALEYGITSDDIFWLKESPGKTLVVGASYV ALECAGFLTIGLDTTVMMRSIPLRGFDQQ MSSLVTEHMESHGTQFLKGCVP SHIKKLPT NQLQVTWEDHASGKEDTGTFDTV LWAIGR VPETR TLNLEKAGISTNPKNQKIIVDAQEAT SVPHIYAIGDVAEGRPELTPTAIKAGKLLAQ RLFGKSSTLMDYSNVPTTVFTPLEYGCVGL SEEEAVALHGQEHVEVYHAYYKPLEFTVAD RDASQCYIKMVCMREPPQLVLGLHFLGPN AGEVTQGFALGIKCGASYAQVMQTVGIHPT CSEEVVKLHISKRSGLEPTVTGCUG</p> <p>(<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_038739.2">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_038739.2</a>; 10.07.2012)</p>

## 11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Markus Brielmeier für die Überlassung dieses interessanten Themas und die stets freundliche und geduldige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Bernhard Aigner für die Übernahme meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät und für seine konstruktive Kritik, mit der er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Roland M. Schmid für seine Ratschläge und Kritik in den Thesis Committees und die Bereitstellung seiner Räumlichkeiten und Arbeitsmittel.

Ganz besonders bin ich Herrn Dr. Dieter Saur und Frau Barbara Seidler zu Dank verpflichtet, die mich herzlich aufgenommen haben. Besten Dank für eure Strategie, die kontinuierliche Unterstützung und Förderung, sowie das Teilen eures enormen Erfahrungs- und Wissensschatzes. Auch wenn ich nicht da war, so hattet ihr doch immer ein offenes Ohr für mich und meine Probleme. Vielen lieben Dank Babsi für deine Hilfe, wenn mal wieder ein unerwartetes Ergebnis auftrat!

Herrn Dr. Ralf Kühn danke ich für die Bereitstellung der IDG3.2 ES-Zelllinie und der Laborräumlichkeiten sowie Arbeitsmittel.

Ferner gilt mein Dank Frau Susanne Bourier für ihre großartige Unterstützung und ihr Engagement bei oft widerspenstigen ES-Zellen, sowie für die Durchführung der Southern Blots. Trotz mehrmaligen Wiederholens hast du nicht aufgegeben und dafür möchte ich dir von Herzen danken!

Vielen Dank auch an Frau Adrianne Tasdemir und Frau Susanne Weidemann für die Blastozysteninjektion, sowie an Frau Diana Bulian für den anschließenden Transfer.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Julia Zorn für das intensive und zügige Korrekturlesen, ihre Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Ratschläge bedanken.

Frau Dr. Claudia Kiermayer danke ich für ihre stete Hilfe in allen Belangen und die angenehme Atmosphäre im Büro.

Auch möchte ich mich bei Frau Viola Maag, Frau Susan Feistenauer und Frau Dr. Annalena Riedasch für das Korrekturlesen und das „in Form bringen“ der Arbeit bedanken.

Ich danke allen Tierpflegern und TAs für die gute Pflege meiner Mäuse.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung. Die lustigen Stunden im Labor haben den Alltag oft versüßt!

Ich möchte mich bei meinen Freunden für die moralische Unterstützung bedanken, insbesondere bei Julia, die seit vielen Jahren und über viele Kilometer hinweg immer ein offenes Ohr für mich hat.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich unterstützt haben, und meiner Schwester Manuela, die mir diesen Weg schon sehr früh geebnet hat.

Mein besonderer Dank geht an Joachim für seinen steten Glauben an mich und seine uneingeschränkte liebevolle Unterstützung während des Studiums und der Promotion (ova).